

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

LOUIS MARTIN

(1864-1946)

Le Dr Louis Martin, Directeur honoraire de l'Institut Pasteur, a succombé le 13 juin 1946 dernier. Devant sa famille, ses anciens collègues, ses élèves et la foule nombreuse de ses amis groupés autour de son cercueil dans le Jardin d'hiver de l'hôpital Pasteur, M. Tréfouël, Directeur de l'Institut Pasteur, lui a rendu un dernier hommage dans les termes suivants :

Notre émotion est grande et notre peine profonde d'adresser un suprême adieu au dernier des collaborateurs directs de Pasteur, Louis Martin, car nous aimions l'homme autant que nous honorions le savant.

Nous voici réunis autour de lui, une dernière fois en cet hôpital, qui restera sa pensée vivante et qui est l'œuvre maîtresse de Louis Martin. Il en fût, non seulement le créateur, mais encore l'animateur pendant de longues années et jusqu'à ses tout derniers moments ses pensées se sont portées vers cet hôpital, auquel il a donné le meilleur de son temps, de ses soins, de son énergie.

Afin de matérialiser son souvenir et celui de M. Roux, le Professeur Pasteur Valléry-Radot, Président de notre Conseil d'Administration, et la Direction de l'Institut Pasteur, ont décidé que l'un des deux pavillons porterait le nom de Louis Martin, et l'autre

celui d'Emile Roux. Il nous a semblé que cet hommage serait doux à Louis Martin qui a prodigué ici son action bienfaisante. C'est ici, en effet, qu'il établit la valeur du principe de l'isolement individuel, pour les maladies épidémiques, qu'il appliqua la sérothérapie antidiphtérique, alors à ses débuts, qu'il montra la valeur thérapeutique de l'atoxyl et de l'émétique dans la maladie du sommeil et utilisa, pour injecter ces médicaments, la voie intraveineuse qui devait rendre tant de services pour le traitement des syphilitiques par l'arsénobenzol. Des milliers de contagieux doivent la vie à la science et au dévouement de Louis Martin, de ses collaborateurs et des Sœurs de l'hôpital. L'hôpital Pasteur restera une des plus belles œuvres de Louis Martin, parce qu'il est de pensée pastorienne, parce qu'il permet d'heureuses applications thérapeutiques et d'intéressantes recherches scientifiques et parce qu'enfin, il a servi de modèle à presque tous les hôpitaux pour maladies contagieuses construits dans le monde.

Ici, tout près de nous, dans son laboratoire, Louis Martin a poursuivi les plus importants de ses travaux sur la diphtérie, le diagnostic bactériologique de cette redoutable affection, l'étude des propriétés du bacille diphtérique et du milieu qui convient le mieux à sa croissance, ainsi qu'à la production de toxine, et qui est partout connue sous le nom de « milieu Martin ».

Lorsque la célèbre communication, faite en 1894 au Congrès de Budapest par E. Roux, L. Martin et Chaillou, eut montré que le pronostic de la diphtérie était complètement modifié par l'emploi du sérum et fait entrer dans la pratique la sérothérapie antidiphtérique, L. Martin fut chargé de la direction du Service de Sérothérapie qui venait d'être créé à l'Institut Pasteur. Il résolut avec le plus grand succès, les multiples problèmes techniques que comporte la préparation régulière de centaines de milliers de doses de sérums thérapeutiques. Lorsque vint la guerre de 1914 et que l'Armée eut des besoins importants et pressants de sérum, L. Martin sut faire face, immédiatement, à la situation. De 1914 à 1918, le Service de Sérothérapie qu'il dirigeait put délivrer à la France et aux Alliés, la totalité des doses exigées par les Services de Santé militaires et civils. Louis Martin n'a jamais cessé d'étudier la diphtérie avec ses collaborateurs et particulièrement avec Loiseau, Darré, Dujarric de la Rivière, Dumas, Laffaille et les frères Gidon. A maintes reprises, les Pouvoirs publics ont eu recours à son expérience pour arrêter la propagation d'épidémies diphtériques.

Par ailleurs, ses travaux sur la spirochétose ictérique, commencés en 1916, pendant la guerre, avec A. Pettit et L. Vaudremer, ont mis au point notre connaissance de cette question. D'autres recherches ont porté sur la maladie du sommeil, la syphilis, la tuberculose.

L. Martin fut un grand hygiéniste. Il obéissait ainsi à l'idée de Pasteur qui disait « n'avoir jamais songé, en pensant à une maladie, à lui trouver un remède mais toujours, au contraire, à trouver une méthode capable de la prévenir ». L. Martin a fait beaucoup pour le développement de l'hygiène en France. Directeur, avec G. Brouardel, du *Traité d'Hygiène*, auteur d'un *Traité* classique d'hygiène hospitalière, il a dirigé avec grande autorité, le Conseil supérieur d'Hygiène publique de France, ainsi que nombre de Commissions au Ministère de la Santé ou à l'Hôtel de ville. Sa réelle connaissance des questions traitées, sa claire vision des solutions à adopter, son honnêteté et son impartialité en faisaient un arbitre incontesté.

Administrateur remarquable, sa direction de l'Institut Pasteur a été marquée par une grande prospérité financière, d'heureuses initiatives et une parfaite compréhension de la grande liberté qui doit être laissée aux travailleurs scientifiques.

Louis Martin devait à son origine maints traits de son caractère. Né au Puy, il avait hérité de « l'âpre terre » du Velay, la ténacité des gens de ce pays. Il avait au plus haut degré cette « patience dans les longs efforts », que Pasteur prisait par-dessus tout. Il cachait une très grande bonté, sous une apparence parfois un peu rude, mais, alors même que son visage restait impassible, son regard ne pouvait dissimuler les vibrations de son cœur et de sa sensibilité.

Sa vie se confondait, en quelque sorte, avec sa fonction. Il ne quittait guère l'Institut que pour se rendre, quelquefois, à sa propriété de Clamart ou dans son Velay natal.

Sa vie s'est écoulée simple, laborieuse et familiale. Les honneurs sont venus ; l'Institut, l'Académie de Médecine, la présidence de nombreuses Sociétés Savantes, la grand croix de la Légion d'honneur. Rien n'a diminué sa modestie, parce qu'elle était dans sa nature même.

A Madame Louis Martin, qui fut pour lui une compagne idéale et dont aucun mot ne peut exprimer assez fortement le magnifique dévouement ; à ses enfants, et particulièrement à son fils et continuateur René Martin ; à son frère, Monsieur le ministre Germain Martin, administrateur, trésorier de l'Institut Pasteur, et à sa famille, si cruellement éprouvée, nous adressons l'expression sincère de notre douloureuse sympathie.

Le souvenir de Louis Martin vivra dans notre Maison parce qu'elle est pour beaucoup la sienne et parce que l'exemple de ce savant et de cet homme de bien, comme celui de Roux et de Calmette, nous incitera à un dévouement de plus en plus grand à la cause de l'Institut Pasteur. Travailler à la grandeur de cet Institut sera la meilleure façon de porter le deuil de nos Maîtres, les premiers pastoriens ; c'est celle qu'ils eussent assurément préférée.

L'ASSOCIATION PNEUMOCOQUE-BACILLE DE YERSIN

"in vivo et in vitro"

par G. GIRARD (*)

(Institut Pasteur. Laboratoires des Instituts Pasteur d'outre-mer.
Service de la peste.)

L'association du pneumocoque au bacille de Yersin dans les différentes formes de l'infection pesteuse est une constatation fort ancienne puisqu'elle est contemporaine de la découverte de Yersin et provoqua, comme l'a souligné E. Dujardin-Beaumetz, la méprise de Kitasato. Mais c'est dans la pneumonie pesteuse que cette infection mixte présente une signification toute particulière, et nous y avons insisté en 1927 dans une étude sur l'épidémiologie de la peste pulmonaire à Madagascar [1].

Dès 1905, W. J. Goss [2], infectant des cobayes et des rats avec les deux microbes à la fois, note que les deux infections évoluent d'ordinaire indépendamment l'une de l'autre ; l'infection pneumococcique évolue la première et peut masquer l'infection pesteuse ; après la mort des animaux qui ont reçu les deux germes, la culture du bacille pesteux peut être retardée jusqu'au dixième ou douzième jour. En dehors de l'organisme, en bouillon et sur gélose, le pneumocoque et le bacille pesteux vivent bien ensemble ; toutefois au début, le premier peut masquer le second et retarder sa prolifération ; mais le bacille pesteux reprend bientôt sa vitalité et sa virulence n'est en rien modifiée.

De notre côté, nous résumons nos observations et nos expériences dans les deux propositions suivantes :

1° Dans la peste pulmonaire humaine, lorsqu'il y a association, le pneumocoque précède toujours le bacille pesteux dont il retarde momentanément le développement.

2° L'association pneumocoque-bacille de Yersin, au sortir de l'organisme (crachat) crée chez le cobaye une infection plus rapidement mortelle que chacun des deux germes inoculé séparément.

De cette constatation expérimentale, nous avons cru devoir attribuer au pneumocoque un rôle favorisant dans la détermination des premiers cas de pneumonie pesteuse, point de départ de foyers dont l'extension n'allait plus dépendre que du bacille pes-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 11 octobre 1945.

teux seul, exalté dans son pouvoir pathogène par son association préalable au pneumocoque. Nous savons, en effet, qu'un pesteux pulmonaire ne devient pratiquement contagieux que lorsque son expectoration renferme le bacille pesteux à *l'état de pureté*. En bref, il semblait y avoir une sorte d'antinomie, le pneumocoque empêchant ou retardant le développement du bacille pesteux, mais intervenant sur ce dernier pour augmenter ses propriétés pathogènes et provoquer des manifestations pulmonaires hautement contagieuses d'homme à homme.

En 1926, lors d'une discussion devant la Société de Pathologie exotique sur la gravité et la contagion de la peste pulmonaire, Dujardin-Beaumetz exprimait une opinion qui reflétait déjà cette antinomie [3]. Tout en reconnaissant que le pneumocoque aggravait la peste purement ganglionnaire, il se demandait, en faisant état des expériences de Goss, si la présence du pneumocoque ne conférerait pas une certaine immunité contre la contamination dans la peste pulmonaire, et s'il n'existerait pas une corrélation entre sa présence et la non contamination. Dans son « Treatise on pneumonic plague » (Genève, 1926, p. 221), Wu Lien Teh consacre un chapitre à l'infection mixte, mais il ne fait aucune allusion aux travaux de Goss, pas plus qu'à un antagonisme possible entre le pneumocoque et le B. pesteux qui ne fut envisagé par aucun des auteurs auxquels il emprunte sa documentation.

A la vérité, la participation du pneumocoque au début du processus qui aboutit à la pneumonie pesteuse chez des contacts infectés par du bacille pesteux à *l'état pur*, pose un problème qui n'a jamais reçu de solution. On connaît l'hypothèse de N. White, reprise par Ch. Nicolle et E. Gobert, invoquant l'association d'un virus aux agents spécifiques de la pneumonie à pneumocoques et de la peste pulmonaire qui, l'une et l'autre, sont susceptibles de se manifester sous la forme épidémique [4]. Mais aucun fait démonstratif n'est encore venu confirmer une telle hypothèse. Au surplus, au point de vue où nous nous plaçons, quelle peut être l'origine de ce pneumocoque? Nous pensons qu'il s'agit d'un commensal des voies respiratoires supérieures qui, à la faveur du contage pesteux, acquiert une virulence exceptionnelle. A cet égard, sont particulièrement suggestives nos observations concernant des Européens (dont la sensibilité au pneumocoque ne peut être comparée à celle des indigènes) qui ont éliminé, dans une salive qui n'avait d'anormal que son abondance, du pneumocoque en quantité considérable pendant plusieurs jours et n'ont présenté d'autres symptômes qu'une fièvre légère et un peu de trachéo-bronchite, sans aucune atteinte de l'état général. Puis, au cours d'examen systématiques pratiqués plusieurs fois par jour, on vit apparaître quelques coccobacilles Gram-négatifs et le tableau clinique se modifier très rapidement pour affecter celui de la bronchopneumonie pesteuse avec son cortège symptomatique.

impressionnant et son évolution fatale en vingt-quatre ou quarante-huit heures. Dès lors, dans l'expectoration rosée pathognomonique, le pneumocoque avait totalement disparu. Tant que ce germe était seul visible, les cobayes supportaient sans dommage l'inoculation des crachats sur peau rasée et excoriée ; mais quand les premiers coccobacilles suspects étaient mis en évidence, ce mode d'inoculation entraînait la mort des animaux en quarante-huit heures et les deux germes étaient retrouvés dans les organes et dans le sang du cœur, le pneumocoque étant de loin le plus nombreux. Les crachats devenaient-ils franchement pesteux, les cobayes faisaient alors une peste septicémique classique, évoluant en quatre ou cinq jours, et le pneumocoque n'était plus décelable.

Devant ces constatations, n'étions-nous pas fondé à considérer le pneumocoque comme un agent favorisant ces pneumonies pesteuses, sans préjuger en rien de son origine ni des modalités de son action ? Mais ce n'était là qu'une supposition, non applicable à la généralité des cas de peste pulmonaire, puisque « la phase pneumococcique » n'est pas indispensable et qu'au cours d'épidémies constituées, le bacille pesteux est seul en cause, comme il suffit à provoquer chez l'animal une pneumonie pesteuse expérimentale.

Le pneumocoque peut, en outre, chez les pesteux pulmonaires, se rencontrer dans les lésions mêmes du poumon, mais, là encore, sa répartition est distincte de celle du bacille de Yersin. Rappelons quelques observations.

1° Trois indigènes habitant la même case meurent à quelques heures d'intervalle, suspects de peste pulmonaire en raison de l'épidémie qui règne dans le village. Les frottis d'organes nous montrent : chez l'un, du bacille pesteux à l'état pur dans chaque poumon ; chez le second, du bacille pesteux dans un poumon, du pneumocoque dans l'autre ; chez le troisième, du pneumocoque dans les deux poumons.

2° Au cours d'une épidémie de famille à Tananarive, nous sommes amené à pratiquer l'autopsie d'un des membres de cette famille qui s'est enfui pour venir mourir dans une localité voisine. Le poumon droit est hépatisé dans son tiers supérieur, et dans ce bloc pneumonique nous trouvons d'innombrables pneumocoques avec de rares coccobacilles suspects qui, en d'autres circonstances n'auraient pas retenu notre attention ; mais la base de ce poumon, ainsi que la totalité du poumon opposé, sont distendues par une sérosité sanglante qui foisonne de bacilles pesteux à l'exclusion de tout pneumocoque.

Nous retrouvions là, en somme, une transposition assez fidèle des images que nous avait révélées l'examen de l'expectoration, et nos observations s'accordaient avec les constatations expérimentales de Goss.

Il nous apparaît aujourd'hui que l'inhibition exercée par le pneumocoque sur le bacille pesteux n'est qu'un des aspects d'un phénomène très général signalé par plusieurs auteurs notamment par Eijkman, McLeod et P. Govenlock [5], O. T. Avery et H. J. Morgan [6], G. P. Alivatos [7], et mis particulièrement en relief par E. Dujardin-Beaumetz, sur les propriétés antibiotiques du pneumocoque qui s'exercent vis-à-vis d'un nombre considérable de micro-organismes [8]. Sans s'être spécialement attaché à l'action du pneumocoque sur le bacille de la peste, celui-ci figure dans la liste des germes cités par Dujardin-Beaumetz comme sensibles au pouvoir antibiotique du pneumocoque.

Afin de préciser cette action, nous avons procédé à une série d'expériences dont nous avons pu tirer quelques déductions intéressantes qui trouveront place à la fin de cet exposé.

LES COMPORTEMENTS DU PNEUMOCOQUE ET DU BACILLE PESTEUX ASSOCIÉS DANS LES MILIEUX DE CULTURE.

A. MILIEUX LIQUIDES. — 1° *Milieu T et bouillon sérum.* — Ces deux milieux conviennent parfaitement à la culture des deux germes. Leur ensemencement simultané à la température de 34° provoque, en vingt-quatre heures, un trouble très marqué dû au développement rapide du pneumocoque, le bacille pesteux n'étant représenté que par de rares chaînettes. Cet aspect se maintient pendant cinq à six jours après quoi l'examen des frottis ne révèle plus qu'une multitude d'éléments ne prenant pas le Gram et qui proviennent en majorité de l'autolyse du pneumocoque. Dans de tels frottis, il est difficile de reconnaître des coccobacilles pesteux. Si l'ensemencement au départ a été suffisant, ils n'en sont pas moins présents et encore vivants, car en portant les tubes de culture à 20°, après un intervalle variant, selon les essais, de cinq à vingt jours, les bacilles pesteux commencent à se développer avec leurs caractères habituels en milieu liquide (voile, grumeaux, chaînettes). Mais si l'on avait fait un repiquage de la culture mixte originale, après vingt-quatre ou quarante-huit heures, alors que le pneumocoque était en pleine vitalité, le bacille pesteux n'aurait pu être mis en évidence dans cette subculture.

2° *Bouillon nutritif et eau peptonée.* — Sur ces milieux non additionnés de glucose ou de sérum, le pneumocoque ne donne que des cultures très grêles ; toutefois, les choses ne se passent pas différemment en ce qui concerne le bacille pesteux. L'inhibition passagère de sa croissance est donc indépendante de la quantité des pneumocoques qui cultivent avec lui. Cette remarque avait déjà été faite par L. Cotoni à propos de l'action antibiotique exercée par le pneumocoque sur les spores de *B. subtilis* [9].

Tels sont les résultats observés lorsque les tubes de cultures associées sont portés à l'étuve à 34° qui est favorable au développement des deux germes. A 37°, température à laquelle le bacille pesteux pousse mal et meurt après quelques jours, le pneumocoque inhibera complètement sa culture. Par contre, à 26° et mieux à 20°, quel que soit le milieu, le bacille pesteux pourra généralement être repiqué de la culture à tout moment, et cela avec d'autant plus de succès qu'il aura au départ été ensemencé plus largement par rapport au pneumocoque.

B. MILIEUX SOLIDES. — Les constatations sont du même ordre que celles qui sont faites en milieux liquides. Sur gélose T ou gélose sérum dont la surface, d'abord largement ensemencée avec du bacille pesteux, est ensuite totalement recouverte par l'étalement de deux gouttes d'une jeune culture de pneumocoque, seul ce dernier se développe à 34°. Quelques colonies isolées de bacille pesteux apparaîtront plus tard dans certains tubes lorsqu'ils auront été mis à la température du laboratoire (20° environ) mais dans d'autres le bacille pesteux aura disparu. On aura plus de chance de le retrouver si l'ensemencement mixte a été fait sur gélose nutritive ordinaire. Enfin, là comme précédemment, jouera le facteur température ; l'on se rappellera que le bacille pesteux se développe très bien à 20°, avec seulement un à deux jours de retard sur les cultures placées à 30-34°.

Si, au lieu de recouvrir la totalité de la surface de la gélose avec la suspension de pneumocoques on se borne à pratiquer quelques touches, l'effet antibiotique ne se manifeste qu'autour des points touchés où de fines colonies de pneumocoques constituent des plages claires sur le fond uniforme de la culture de peste. Cet aspect est celui qu'avait signalé E. Dujardin-Beaumetz avec tous les microorganismes sensibles à l'action du pneumocoque. A la limite de ces plages, le bacille pesteux existe à l'état de pureté. Quand le pneumocoque aura perdu sa vitalité, soit après cinq à six jours, le bacille pesteux gagnera progressivement pour bientôt recouvrir entièrement la plage en quelques jours à la température de 20-25°.

En résumé, l'action inhibitrice du pneumocoque à l'égard du bacille pesteux est d'autant plus marquée que le pneumocoque est placé dans des conditions qui favorisent sa culture, le facteur température étant prédominant. Le bacille pesteux peut n'être plus repiquable, s'il n'a été ensemencé très largement, lorsque la culture mixte a été laissée quelques jours à 32-34°. Il ne s'agit plus alors d'inhibition, mais d'une véritable destruction ressemblant à une lyse ; toutefois, cette lyse n'est pas transmissible ; le bacille pesteux ensemencé dans un filtrat de culture de pneumocoques y pousse normalement, aussi bien que dans les cultures où le pneumocoque a été tué par chauffage. Le pouvoir empêchant

exercé par le pneumocoque est donc lié à sa vitalité. Mais lorsque les cultures mixtes après quelques jours à 32-34° sont portées à 20° et que le bacille pesteux commence à proliférer, le pneumocoque qui a cessé de croître avant de s'autolyser n'est pas nécessairement mort. Il est possible, en effet, de le voir cultiver seul si l'on fait un repiquage en milieu T à 34°, tandis qu'à 20° on n'aurait que du bacille pesteux. Plus tard, le pneumocoque étant complètement lysé, les repiquages ne donneront que du bacille pesteux, à 34° comme à 20°.

De son côté, le bacille pesteux n'exerce aucune action retardatrice sur le développement du pneumocoque. Ensemencé dans un bouillon pesteux de quatre jours, le pneumocoque croîtra rapidement comme dans un milieu neuf, à condition naturellement qu'on ait, au préalable, rendu le bouillon favorable par addition de sérum ou de glucose, et réajustement du pH autour de 7,6.

Nos expériences ont été faites avec deux souches de pneumocoques, type I et type II, virulents et solubles dans la bile, que nous devons à l'obligeance de nos collègues Cotoni et Nitti que nous tenons à remercier ici. Avec un pneumocoque insoluble et dépourvu de virulence, souche K 24 (L. Cotoni) aucune inhibition n'a été notée à l'égard du bacille pesteux, malgré la vitalité de ce pneumocoque qui cultive abondamment sur tous les milieux usuels. Cotoni et Dujardin-Beaumetz avaient signalé l'absence ou la réduction notable du pouvoir antibiotique des pneumocoques atypiques.

Par quel processus s'exerce cette inhibition ? Aucune réponse satisfaisante n'a encore été donnée à la question. A propos de l'action du pneumocoque sur *B. subtilis*, Cotoni a envisagé plusieurs hypothèses sans parvenir par l'expérimentation à résoudre le problème. Il paraissait vraisemblable d'attribuer, comme le firent Mc. Leod et Govenlock, Avery et Morgan, à la production d'eau oxygénée cet effet inhibiteur, mais Cotoni ne confirme pas ce point de vue. Pour ce qui est du bacille pesteux, nous pensons que la présence de peroxyde intervient, au moins partiellement, dans la détermination du phénomène. Nous avons constaté, en effet, que toutes conditions identiques par ailleurs, l'addition d'un fragment stérile de pomme de terre fraîche avant l'ensemencement simultané des deux germes, réduisait notablement le pouvoir antibiotique du pneumocoque, sans cependant le faire disparaître. Cet apport de catalase avait entraîné la destruction de l'eau oxygénée au fur et à mesure de sa production au point que sa présence ne pouvait être mise en évidence par la réaction à la benzidine qui était fortement positive dans les tubes témoins. Dans cet ordre de faits, soulignons que le pneumocoque atypique K 24, dépourvu de toute action empêchante vis-à-vis du bacille pesteux, ne produit pas d'eau oxygénée.

RÉACTION DU COBAYE A L'INOCULATION DE CULTURES MIXTES :
PNEUMOCOQUES ET BACILLES PESTEUX.

Allions-nous, en inoculant sur peau rasée et légèrement exco-riée les deux germes associés en culture, faire des constatations rappelant celles des cobayes soumis à l'infection par la même voie avec crachats humains renfermant à la fois pneumocoques et bacilles de Yersin ? Il n'en a rien été. Loin de provoquer une infection suraiguë, à laquelle participent les deux germes que l'on retrouve dans les frottis de rate et que l'on peut isoler par hémoculture à 37° et à 20°, l'inoculation de culture associée a été suivie d'une infection pesteuse pure, du type subaigu, dont l'évolution a été sensiblement la même que celle des cobayes témoins qui n'avaient reçu que du bacille pesteux. A l'autopsie, le pneumocoque n'a pu être mis en évidence. L'inoculation intrapéritonéale a conduit à des résultats analogues. Si deux fois sur quatre nous avons retrouvé dans l'exsudat péritonéal les deux germes, un nouveau passage de cet exsudat sur peau exco-riée d'un cobaye neuf n'a été suivi que d'une lésion locale qui a guéri en quelques jours. Le tableau suivant condense les résultats de ces expériences.

MATÉRIEL INOCULÉ	MODE D'INOCULATION	
	Friction sur peau rasée	Péritoine (0,2 c.c.)
culture en bouillon (48 h. à 34°)		
Pneumo + Peste	4 (8, 5, 8, S.)	4 (3, 9, 4, 3.)
Peste	4 (4, 5, 8, S.)	4 (1, 3, 8, 2.)

(Le 1^{er} chiffre indique le nombre d'animaux inoculés. Ceux (....) le délai de survie en jours. S = survie définitive.)

Ces résultats appellent quelques commentaires. Nous ne les donnons pas définitifs, ils ne valent que pour les conditions dans lesquelles nous avons opéré. Nous ne les opposons pas à ceux que nous avons obtenus à Madagascar où nous n'avons pas expérimenté avec des cultures mixtes, mais avec des crachats, ce qui est tout différent. De plus, la virulence de notre souche de peste, bien que venant de Madagascar, est faible si on la compare à celle des souches fraîchement isolées de l'homme ou du rat. Le fait que des cobayes aient résisté à la peste tandis que d'autres succombaient à une infection aiguë ou même suraiguë est ici d'observation courante. Dujardin-Beaumetz l'avait également constaté. Nous l'attribuons à deux causes :

1° L'affaiblissement de la virulence des souches par suite des variations de température auxquelles elles sont soumises pendant leur transport, notamment par avion quand le voyage dure plusieurs jours.

2° L'existence de la pseudo-tuberculose qui affecte les élevages et qui engendre chez les cobayes survivant à son atteinte une immu-

nité parfois très solide. Jamais à Tananarive où la pseudo-tuberculose des rongeurs est encore inconnue nous n'avons observé de telles irrégularités dans nos expériences sur le cobaye, qu'il s'agisse de souches venant d'être isolées, ou de souches entretenues par repiquages et maintenues à basse température (2-4°), comme nous le faisons à Paris.

Dès que les circonstances le permettront, il sera indiqué de reproduire à Madagascar, cette fois avec des cultures, les expériences antérieures. Il ne sera pas moins intéressant de comparer les effets de l'inoculation au cobaye de l'expectoration de malades atteints de pneumonie à pneumocoques, en dehors de tout soupçon de peste, matériel auquel on ajoutera une culture de bacille pesteux. Ces recherches auront pour effet de préciser le rôle possible d'un facteur associé (virus?) dans la détermination du processus qui aboutit à la pneumonie pesteuse, après une étape pneumococcique.

DÉDUCTIONS TIRÉES DES FAITS PRÉCÉDEMMENT EXPOSÉS.

Les données relatives au pouvoir antibiotique du pneumocoque comportent dans la peste humaine un certain nombre de déductions qui intéressent à la fois le microbiologiste, l'hygiéniste et le clinicien.

Rappelons tout d'abord que le pneumocoque existe souvent dans le sang au cours de l'infection pesteuse, alors que le coccobacille spécifique n'y est encore qu'à l'état d'éléments isolés, car la septicémie n'est qu'une manifestation tardive, symptomatique d'une rapide issue fatale. Une hémoculture pratiquée au début devra être placée à basse température, non pas tant parce que le bacille pesteux pousse mal à 37°, fait bien connu, mais pour mettre un pneumocoque éventuel dans l'impossibilité de se développer. Il faut éviter de commettre l'erreur de Kitasato. C'est autour de 20° que les conditions seront au mieux réalisées. Le bacille pesteux y cultivera certes moins rapidement qu'entre 26 et 34°, mais à ces températures un pneumocoque croîtra suffisamment déjà pour exercer son pouvoir empêchant. S'il n'y a que présomption de peste et que l'on envisage la possibilité d'autres germes pathogènes, on dédoublera le matériel ensemencé, un tube ou un ballon mis à 37°, l'autre à 20°. Pour avoir méconnu cette règle qui est impérative en pays d'endémo-épidémie, des pneumocoques furent parfois seuls isolés chez des malades reconnus pesteux à la suite d'examen *post mortem* avec identification ultérieure du bacille de Yersin. Il s'agissait alors généralement de peste à bubons non apparents, dite septicémique, observée chez des enfants. Avec la double hémoculture, on pourra obtenir du pneumocoque à 37°, du bacille pesteux à 20°.

On sait aussi que l'inoculation d'un crachats suspect de contenir du bacille pesteux ne doit jamais être faite à la souris, mais au cobaye, à cause de la grande susceptibilité de la souris au pneumocoque. Si cette technique a été adoptée, c'est qu'on savait depuis longtemps l'association fréquente des deux germes dans l'expectoration des malades soupçonnés ou atteints de pneumonie pesteuse. L'action inhibitrice du pneumocoque vis-à-vis du bacille de la peste est un argument de plus en faveur de l'emploi exclusif du cobaye pour détecter par le procédé de la peau rasée quelques rares bacilles pesteux au milieu de nombreux pneumocoques.

Mais la nécessité de faire intervenir ce nouveau facteur nous amène à réviser certaines de nos appréciations et à compléter les vues que notre précédente étude de l'épidémiologie de la peste pulmonaire nous avait alors imposées.

La durée d'incubation de la peste chez l'homme ne dépasse pas six jours. C'est ce délai qui a été adopté dans les textes qui régissent la prophylaxie internationale. Mais c'est la peste bubonique qui est essentiellement visée par cette réglementation. Or, dans la peste pulmonaire primitive, l'incubation est parfois prolongée de quelques jours, à telle enseigne qu'à Madagascar on a fixé à dix jours le temps d'observation des contacts dans les lazarets. Il n'est pas impossible que le pneumocoque soit, dans certains cas, à l'origine de ces anomalies. Aucune recherche n'a encore été effectuée dans ce sens.

Mais il y a plus, et l'élimination de pneumocoques par un contact alors qu'il ne présente que peu ou point de symptômes généraux ou locaux est susceptible de compliquer singulièrement le problème du diagnostic. Si, comme nous l'avions généralement observé, le pneumocoque disparaît pour faire place au bacille pesteux en même temps que les signes cliniques se précisent, le diagnostic s'impose. Autant qu'une longue pratique nous l'avait enseigné, la présence de bacille pesteux, *démontrée par l'inoculation au cobaye*, dans des crachats ne se distinguant pas au premier abord et après coloration de frottis de ceux d'une banale trachéo-bronchite était à Madagascar considérée comme un arrêt de mort ; la modification rapide des caractères de l'expectoration, la marche de la maladie confirmaient cette sentence. Par contre, nous tendions à ne voir aucun lien entre le contagement pesteux et cette élimination de pneumocoques survenant chez des isolés dans les délais impartis à la surveillance sanitaire, quand le cobaye restait indemne et que l'individu guérissait. Les pneumococcies sont communes chez les indigènes, et, pour nous, il y avait seulement coïncidence. Nous sommes aujourd'hui moins convaincu. Déjà en 1938, nous avons eu l'occasion de voir deux femmes, la mère et la fille, contacts d'un parent mort de peste pulmonaire typique, être prises simultanément de signes de congestion pulmonaire. Les crachats de ces deux femmes avaient un aspect banal, les pneumocoques

composant la majeure partie de la flore. Cependant, le cobaye éprouvé avec les crachats de la fille mourait de peste aiguë en quatre jours, l'autre restait indemne, mais, fait essentiel et nouveau pour nous, les deux malades guérissaient. Le bacille pesteux avait disparu assez vite de l'expectoration, car les inoculations pratiquées dans la suite étaient restées négatives, et il ne pouvait en être autrement puisque l'évolution devait être favorable. Avec notre conception antérieure, nous aurions conclu que seule la femme qui avait eu à un moment donné du bacille pesteux dans les crachats avait fait une affection pesteuse, l'autre une pneumococcie. Bactériologiquement cette réponse s'imposait, mais l'épidémiologie et la clinique s'accordaient avec le bon sens pour associer dans un même processus ces deux pneumopathies et leur attribuer une même origine. Dans deux autres circonstances nous avons fait de pareilles constatations qui confirment ce point de vue, bien que, dans l'immense majorité des cas, la mise en évidence du bacille pesteux dans l'expectoration, au milieu de nombreux pneumocoques, entraîne toujours, à brève échéance, une issue fatale.

En vérité, nous ne parlons pas de peste pulmonaire guérie, pour les quelques cas auxquels nous faisons allusion ; tout au plus s'agit-il de pestes pulmonaires arrêtées dans leur évolution, car il n'est pas démontré que le bacille pesteux ait dépassé les limites du rhinopharynx et, parfois, les signes pulmonaires ont manqué. A cet égard, nous sommes en complet accord avec J. Robic qui nous a récemment communiqué une nouvelle observation qui s'ajoute aux précédentes. Nous n'ignorons pas qu'en l'absence de preuve bactériologique il paraît difficile d'admettre qu'une affection à pneumocoques est en relation directe avec un contagé pesteux, et a été contractée au moment où le pesteux *n'éliminait que le coccobacille spécifique*. Les faits cependant sont là et ne trouvent guère d'explication que dans l'antagonisme exercé par le pneumocoque vis-à-vis du bacille de Yersin.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

1° Le pneumocoque exerce à l'égard du coccobacille de Yersin un pouvoir inhibiteur qui se manifeste à la fois en bouillon et sur gélose. Cette action est d'autant plus marquée que la culture mixte a été placée dans un milieu et à une température favorables à la croissance du pneumocoque, bien que ces conditions ne soient pas moins favorables à la croissance du bacille pesteux ; ce dernier peut n'être plus décelable par repiquage, à moins qu'il n'ait été au départ ensemencé très abondamment. Cette propriété antibiotique appartient aux divers groupes de pneumocoques, sous réserve qu'ils soient restés pathogènes et solubles dans la bile ou les sels biliaires.

2° *In vivo*, le pneumocoque peut apparaître dans l'expectoration avant le bacille de Yersin à la phase de début d'une pneumonie pesteuse. Il en retarde l'évolution qui n'en reste pas moins normale lorsque le pneumocoque ayant disparu, le coccobacille spécifique se développe seul en imprimant à la maladie sa physiologie classique avec sa terminaison fatale.

3° Le bacille pesteux a quelquefois été décelé par l'inoculation au cobaye de l'expectoration de contacts de pesteux pulmonaires sans que ces suspects aient présenté de signes réels de pneumopathie, les symptômes se bornant parfois à une légère élévation de température. Le pneumocoque constaté dans l'expectoration de ces isolés soumis à une stricte observation a vraisemblablement arrêté l'évolution de la maladie. Avec une symptomatologie identique, d'autres personnes soumises aux mêmes risques de contagion n'ont éliminé que du pneumocoque et ont aussi guéri.

4° Si la fréquence de l'association pneumocoque-bacille de Yersin comporte un certain nombre de conséquences d'ordre pratique relatives au diagnostic et à la prophylaxie de la peste pulmonaire, nous ignorons tout du processus qui détermine cette manifestation pneumococcique à l'occasion d'un contage pesteux « pur ». L'hypothèse d'un virus associé, formulée par N. White est la seule qui ait été envisagée. Elle a été retenue par Ch. Nicolle et E. Gobert qui ont pensé attribuer ce rôle au virus grippal. Mais nulle part, et notamment à Madagascar où nos observations portent sur près de vingt ans, la grippe saisonnière n'a provoqué une recrudescence des complications pulmonaires au cours des épidémies de peste.

Enfin, la peste pulmonaire n'est peut-être pas la seule affection qui subisse du fait de la présence du pneumocoque des modifications dans son évolution puisque, comme l'a montré E. Dujardin-Beaumetz, son pouvoir antibiotique s'étend, *in vitro*, à la plupart des germes pathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GIRARD (G.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1927, **20**, 645-652.
- [2] GOSS (W. J.), *Arch. Sci. Biol. ed. Russe*, **10**, n° 5, 405-453 ;
Analyse *Bull. Inst. Pasteur*, 1904, **2**, 908.
- [3] DUJARDIN-BEAUMETZ (E.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1926, **19**, 670.
- [4] NICOLLE (Ch.) et GOBERT (E.), *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1924, **13**, 224.
- [5] MC LEOD (J. W.) et GOVENLOCK (P.), *Lancet*, 1921, **1**, 900.
- [6] AVERY (O. T.) et MORGAN (H. J.), *J. exp. Med.*, 1924, **39**, 275-287.
- [7] ALIBATOS (G. P.), *Centralbl. f. Bakt.*, 1925, **94**, n° 1, 66.
- [8] DUJARDIN-BEAUMETZ, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 890.
- [9] COTONI, *Ces Annales*, 1939, **62**, 133.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A *SALMONELLA*

I. — LE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DES SOUCHES DE *SALMONELLA*

par A. BONNEFOI et M^{me} J. GRABAR (*).

(Institut Pasteur. Service des vaccins.)

Depuis plusieurs années, nous poursuivons l'étude, aussi complète que le permettent nos connaissances actuelles, des souches isolées de malades atteints de fièvres typho-paratyphoïdes en vue de leur utilisation pour la préparation des vaccins.

Cette étude, qui sera décrite par ailleurs, comprend, en particulier, l'identification sérologique des colonies et la détermination de leur structure antigénique, à l'aide d'immunsérums agglutinants.

Nous rapportons ici le protocole suivi pour cette identification en l'étendant à tous les germes du groupe *Salmonella*. Il présente un double intérêt. En premier lieu, il nous permet d'utiliser, pour la préparation de nos émulsions vaccinales, des souches typiques et complètes antigéniquement. De plus, la technique suivie permettra aux laboratoires cliniques de poser aisément un diagnostic précis d'infection à *Salmonella* en contrôlant, par un test d'agglutination spécifique, les caractères morphologiques et biochimiques d'un microbe isolé d'un produit suspect.

Le groupe des *Salmonella* renferme les bacilles typhiques et paratyphiques d'origine humaine et animale. C'est un groupe déterminé au point de vue culturel et sérologique. Il comprend des bacilles Gram négatif, ordinairement mobiles, qui fermentent le glucose avec production d'acidité et souvent de gaz ; par contre, sauf quelques rares exceptions, ils n'attaquent pas le lactose et le saccharose, et ne produisent pas d'indol.

L'identification d'une souche de *Salmonella* nécessite une étude des caractères biochimiques de la colonie isolée et son examen sérologique. Nous reviendrons plus loin sur la nécessité de cette double étude. L'examen sérologique sur lequel repose essentiellement la classification des *Salmonella*, est rendu possible par la

(*) Société française de Microbiologie, séance du 3 janvier 1946.

découverte, déjà ancienne pour certains, de plusieurs facteurs antigéniques chez ces microbes. Nous allons résumer les notions essentielles sur ces antigènes.

ANTIGÈNES DES BACILLES DU GROUPE *Salmonella*.

Bien que leur connaissance remonte maintenant à un certain nombre d'années, qu'ils aient été décrits à plusieurs reprises [9, 20, 30, 48], ces antigènes ne semblent être familiers qu'à un petit nombre de spécialistes. Nous n'en voulons pour preuves que la correspondance échangée et les fréquentes visites qui nous sont faites au Service des vaccins au sujet de la technique du sérodiagnostic.

La connaissance de la structure antigénique des microbes, qui permet de les identifier et de les classer, est également indispensable à qui doit exécuter correctement un sérodiagnostic. Si nous voulons que le rôle joué par le laboratoire soit chaque jour plus apprécié, et que la clinique y trouve un élément de diagnostic indispensable, nous devons nous efforcer de mériter cette confiance en faisant preuve d'une culture chaque jour plus poussée et en utilisant des techniques dont la simplicité pratique doit être respectée, mais qui doivent se montrer toujours plus précises.

La connaissance de ces différents antigènes est également primordiale pour la fabrication des vaccins, le rôle joué par eux dans le processus d'immunisation étant très inégal.

Nous pouvons schématiser en deux groupes ces différents antigènes.

Antigènes somatiques.	{	Antigènes O.
		Antigènes Vi.
		Antigènes R.
Antigènes ciliaires ou flagellaires.	{	Antigènes H. {
		Spécifiques. Non spécifiques.

On parle de changements de « formes » pour les transformations des antigènes somatiques ; les antigènes H peuvent présenter des changements de « phases ».

ANTIGÈNES O ET H.

Dès 1903, l'existence d'antigènes différents, somatique et flagellaire, chez les formes mobiles des *Salmonella*, avait été montrée par Smith et Reagh [42], mais cette remarquable observation était retombée dans l'oubli.

Weil et Félix [46], en 1917, étudiant le *Proteus* X-19, décrivent deux types d'antigènes sérologiquement différents en relation avec certaines modifications des caractères de culture de la souche. Une des formes, appelée forme « O » (de l'allemand ohne Hauch,

sans nappe), se présente, dans les cultures sur gélose, sous l'aspect de colonies bombées circulaires, lisses ; elle ne renferme qu'un seul antigène, l'antigène O, antigène somatique ; l'autre forme, forme « H » (Hauch, en nappe) envahit toute la surface ; elle possède à la fois l'antigène O, somatique, et l'antigène H, flagellaire.

Weil et Félix, étendant leur découverte aux germes du groupe typho-paratyphique [47], allaient permettre l'étude sérologique de ces germes et confirmer la conception de Maurice Nicolle [37], du microbe « mosaïque » d'antigènes.

FORMES S, R.

A la même date, d'autres auteurs, Legroux et Magrou [34], Arkwright [2], décrivent des aspects différents des colonies dans les cultures.

Certaines des colonies sont de type rugueux (R = rough, rugueux) ; d'autres sont lisses (S = smooth, lisse) : ce sont les colonies normales. L'intérêt de ce type de variation ne réside pas uniquement en une dissociation morphologique des cultures, mais il y a parallèlement une dissociation des caractères biologiques.

FORMES R.

Les formes rugueuses peuvent déjà apparaître lors de l'isolement d'une souche, mais le passage de la forme S à la forme R a surtout lieu, lors de la conservation des souches, au cours des repiquages successifs. On peut aussi obtenir la forme R par culture de la forme S, en présence de sérums anti-O [10, 41].

Nous obtenons personnellement ce passage de la forme S à la forme R par conservation, à l'étuve à 37°, de cultures ensemencées sur gélose très molle (gélose semi-liquide à 0,2 p. 100).

Les formes rugueuses sont caractérisées par l'apparence plus mate, chagrinée, rugueuse même, de la surface des colonies sur gélose ; le bord est irrégulier, dentelé ; ensemencées sur bouillon, le milieu reste souvent limpide, les germes se déposant en culot au fond du tube.

Les formes rugueuses agglutinent, en général, spontanément en solution saline à 0,8 p. 100. Cette agglutination se produit aussi après chauffage et par action de la tryptaflavine [21]. Sertic et Boulgakov [39 bis] ont observé que la tryptaflavine agglutinait également les souches V du bacille typhique (formes pures Vi). Le fait fut vérifié par Kauffmann [28] qui constata, en outre, une agglutination de la phase β et de certaines phases non spécifiques des *Salmonella*. Il faudrait plutôt dire que toute souche non sensible à la tryptaflavine n'est pas R. Nous avons également

observé cette action de la trypaflavine sur les formes V. Le réactif de Millon agglutine aussi les émulsions R [22].

Du point de vue sérologique, les colonies rugueuses ne sont pas agglutinées par l'immunsérum obtenu à partir de la forme S normale. Mais un sérum préparé à l'aide d'une forme R d'une *Salmonella* quelconque agglutine les formes R de toutes les *Salmonella* [40].

L'antigène R diffère des antigènes O et Vi contenus dans les formes S.

Les formes qui possèdent des antigènes glucido-lipidiques (antigènes O et Vi) doivent être considérées comme des formes lisses ; celles qui en sont privées des formes R.

L'ensemble des caractères des formes R : capacité d'agglutination, perte de l'antigène glucido-lipidique..., détermine leur rejet pour la préparation des vaccins ou des émulsions pour séro-diagnostic.

FORMES S.

Les formes S peuvent être mobiles, renfermant les antigènes H et O, ou immobiles, ne possédant que l'antigène O.

Il est d'ailleurs rare d'obtenir des formes O absolument pures. Même la souche O 901, décrite par Félix comme pure, renferme un peu d'antigène H. Nous avons constamment observé une agglutination H en utilisant des sérums de lapins obtenus par injection de la souche O 901 vivante, ou de la même souche ayant subi un chauffage de deux heures à 100° ; le taux d'agglutination H varie du 1/100 au 1/400. Carlinfanti [42] a obtenu des titres très élevés d'agglutination H dans les sérums. Kauffmann [32], à son tour, a injecté à des lapins la souche O 901 ayant subi un chauffage de deux heures à 100°, et a retrouvé des agglutinines H, mais à un taux assez bas : 1/80. Ayant reçu récemment une nouvelle souche O 901 de Londres, nous avons immédiatement immunisé des lapins, après chauffage de la souche deux heures à 100°, et nous avons retrouvé à nouveau une agglutination H.

L'antigène O, appelé également au début antigène somatique, ne peut plus être désigné uniquement ainsi, depuis que l'existence d'autres antigènes somatiques a été mise en évidence. C'est probablement l'antigène somatique principal. Il est thermostable ; il supporte un chauffage de deux heures à 100° ; il supporte également un traitement par l'alcool absolu ou par l'acide phénique dilué ; il est entravé par le formol à 0,5 p 100.

Les travaux de White [48] et Kauffmann [24] ont montré qu'il est constitué de un ou plusieurs facteurs antigéniques séparables sérologiquement. Ces facteurs sont désignés par des chiffres romains : I, II, III, etc.

La plupart des types microbiens possèdent plusieurs facteurs O ;

chaque sous-groupe, des facteurs communs aux différents microbes qui le constituent. Il existe cependant un facteur (facteur XII) qui est commun à tous les groupes [31].

Le facteur XII est partiellement responsable des coagglutinations.

L'antigène O fut extrait par Boivin [5, 6], à partir des corps microbiens, par action de l'acide trichloracétique et, peu après, par Raistrick et Topley [38] par digestion trypsique. Par ces auteurs, l'antigène O est considéré comme un complexe glucido-lipidique, et il possède les propriétés d'un antigène complet [7]. Il représente l'élément majeur de l'endotoxine microbienne.

Morgan [35] extrait l'antigène O par une technique différente ; il tire profit de la solubilité de l'élément antigénique dans le diéthylène-glycol anhydre. Morgan, Henderson et Morgan, Morgan et Partridge [36] étudient cet élément somatique O et le considèrent comme un composé moléculaire homogène contenant une fraction polypeptidiforme ou protéinique, un polysaccharide spécifique et un composé phospholipide.

Les auteurs éliminent le phospholipide, sans porter atteinte à l'activité antigénique de l'extrait ; mais, après dissociation du complexe polysaccharide-protéine, l'élément polysaccharide libéré n'est plus antigénique. Pour ces auteurs, l'antigène somatique O possède une fraction protéinique qui sert de support au polysaccharide spécifique de l'organisme, responsable de ses réactions sérologiques caractéristiques.

A l'antigène O est dû, en grande partie, le pouvoir vaccinant des bactéries [8].

L'antigène O donne naissance à des agglutinines spécifiques anti-O, par immunisation de l'homme ou des animaux.

L'ANTIGÈNE H.

L'antigène H représente l'antigène flagellaire des bactéries mobiles [13].

Il existe dans les formes S et R mobiles. Il est considéré comme thermolabile, détruit par chauffage à partir de 70° (en réalité, sa disparition est due à la destruction de la structure morphologique des cils). Il ne résiste pas à l'alcool absolu, ne se développe pas dans les cultures sur gélose phéniquée, mais il résiste à l'action du formol, tandis que l'antigène O y est sensible. L'antigène H est détruit par les ferments protéolytiques, d'où sa nature protéinique probable. Il nécessite, pour se développer, l'emploi de gélose molle à 2 p. 100 et humide, alors que l'antigène O se contente des milieux ordinaires.

Sa mise en évidence est démontrée par l'agglutination d'une émulsion de germes vivants, mobiles, à l'aide d'un immunosérum

saturé : sérum préparé par injection à un lapin de germes mobiles, vivants, et saturé par une émulsion O pure obtenue par chauffage des corps microbiens à 100°.

Craigie [13] a préparé une émulsion ciliaire qui donne uniquement une agglutination H, mais cette émulsion injectée à un lapin, provoque *in vivo* l'apparition d'agglutinines H et O. La substance ciliaire posséderait un antigène H et un antigène identique à O ou qui a des composés communs avec ce dernier.

L'antigène H ne semble jouer aucun rôle dans le pouvoir pathogène, ni dans le pouvoir vaccinant des bactéries.

Aux deux types d'antigènes O et H correspondent des agglutinines spécifiques qui apparaissent dans le sérum d'un animal après immunisation, ou au cours de la maladie.

Les agglutinations engendrées ont des caractères bien différents.

L'agglutination H est une agglutination en flocons, apparaissant rapidement, facile à dissocier ; elle est due à une inhibition de la mobilité des microbes ; c'est une immobilisation ciliaire.

L'agglutination O apparaît plus lentement ; elle est de type granulaire, due à un accolement polaire des microbes.

L'agglutination H peut manquer chez des souches de bacilles fraîchement isolées, de type O pur, non mobiles ; de telles souches sont extrêmement rares.

PHASES SPÉCIFIQUE ET NON SPÉCIFIQUE DE L'ANTIGÈNE H.

En 1922, Andrewes [4] pénètre la complexité de l'antigène H des *Salmonella* et montre qu'il peut exister sous deux phases sérologiques différentes, mais identiques du point de vue morphologique et culturel : la phase spécifique et la phase non spécifique. L'antigène H est monophasique lorsqu'il existe sous la seule phase spécifique (bacille typhique, paratyphique A) ou non spécifique (*S. abortus equi*, *S. cholerae suis*, var. Kuzendorf). Il est diphasique, lorsque les deux phases sont présentes.

Les facteurs antigéniques H, phase spécifique, sont désignés par les lettres a, b, c... le complexe gm est caractéristique des formes monophasiques spécifiques.

Dans la phase non spécifique, il existe un facteur antigénique H commun pour toutes les *Salmonella* ; toutes les souches en phase non spécifique, agglutinent avec un même sérum anti H non spécifique. Il existe, en outre, dans cette phase des antigènes désignés par les chiffres 2, 3, 4, etc.

Illustrons ces notions par l'exemple suivant :

Si l'on met plusieurs colonies d'une culture de bacille paratyphique B en présence d'immunsérums para B et *typhi murium*, on constate qu'une partie seulement des colonies est agglutinée par

Tableau de Kauffmann et White.

TYPE	ANTIGÈNE O	ANTIGÈNE H	
		Spécifique	Non spécifique
Groupes A et B.			
1. S. paratyphi A	(I), II, XII	a	
2. S. paratyphi B	(I), IV, (V), XII	b	1, 2
3. S. abony	(I), IV, V, XII	b	e, n, x
4. S. typhi murium	(I), IV, (V), XII	i	1, 2, 3
5. S. stanley	IV, V, XII	d	1, 2
6. S. heidelberg	IV, V, XII	r	1, 2, 3
7. S. chester	IV, (V), XII	e, h	e, n, x
8. S. san diego	IV, (V), XII	e, h	e, n, z ₁₅
9. S. saint paul	I, IV, V, XII	e, h	1, 2, 3
10. S. zagreb	IV, V, XII	e, h	1, 2
11. S. kaposvar	IV, V, XII	e, (h)	1, 5
12. S. reading	IV, XII	e, h	1, 5
13. S. derby	(I), IV, XII	f, g	
14. S. essen	IV, XII	g, m	
15. S. budapest	I, IV, XII	g, t	
16. S. californica	IV, XII	g, m, t	
17. S. brandenburg	IV, XII	l, v	e, n, z ₁₅
18. S. bispebjerg	I, IV, XII	a	e, n, x
19. S. abortus equi	IV, XII		e, n, x
20. S. abortus ovis	IV, XII	c	1, 6
21. S. arechavaleta	IV, (V), XII	a	1, 7
22. S. altendorf	IV, XII	c	1, 7
23. S. abortus bovis	I, IV, XXVII, XII	b	e, n, x
24. S. breideney	I, IV, (XXVII), XII	l, v	1, 7
25. S. schleissheim	IV, XXVII, XII	b, z ₁₃	
Groupe C.			
26. S. paratyphi C	VI ₁ , VI ₂ , VII, (Vi)	c	1, 5
27. S. cholerae suis 1	VI ₁ , VII	c	1, 5
28. S. cholerae suis 2	VI ₂ , VII	c	1, 5
29. S. typhi suis		c	1, 5
30. S. thompson		k	1, 5
31. S. virchow		r	1, 2, 3
32. S. oranienburg		m, t	
33. S. potsdam	VI ₁ , VI ₂ , VII	l, v	e, n, z ₁₅
34. S. bareilly		y	1, 5
35. S. hartford		y	e, n, x
36. S. mikawashima		y	e, n, z ₁₅
37. S. montevidéo 1		g, m, s	
38. S. montevidéo 2	VI, VII	g, m, s	
39. S. oslo	VI ₁ , VI ₂ , VII	a	e, n, x
40. S. amersfoort	VI ₁ , VI ₂ , VII	d	e, n, x
41. S. braenderup	VI ₁ , VI ₂ , VII	e, h	e, n, z ₁₅
42. S. newport		e, h	1, 2, 3
43. S. kottbus		e, h	1, 5
44. S. bovis moribificans . . .		r	1, 5
45. S. münchen		d	1, 2
46. S. oregon		d	1, 2, 3
47. S. manhattan	VI ₁ , VIII	d	1, 5
48. S. narashino		a	e, n, x
49. S. glostrup		z ₁₀	e, n, z ₁₅
50. S. litchfield		l, v	1, 2, 3
51. S. düsseldorf		z ₄ , z ₂₄	

TYPE	ANTIGÈNE O	ANTIGÈNE H	
		Spécifique	Non spécifique
Groupe D.			
52. S. typhi	IX, XII, (Vi)	d	
53. S. enteritidis	(I), IX, XII	g, m	
54. S. dublin	I, IX, XII	g, p	
55. S. rostock	I, IX, XII	g, p, u	
56. S. moscow	IX, XII	g, q	
57. S. blegdam	IX, XII	g, m, q	
58. S. berta	IX, XII	f, g, t	
59. S. eastbourne.	(I), IX, XII	e, h	1, 5
60. S. sendai	(I), IX, XII	a	1, 5
61. S. onarimon	I, IX, XII	b	1, 2
62. S. dar es salaam	I, IX, XII	l, w	e, n
63. S. goettingen	IX, XII	l, v	e, n, z ₁₅
64. S. panama	I, IX, XII	l, v	1, 5
65. S. gallinarum	IX, XII		
Groupe E.			
66. S. london.	III, X, XXVI	l, v	1, 6
67. S. give		l, v	1, 7
68. S. uganda		l, z ₁₃	1, 5
69. S. anatum		e, h	1, 6
70. S. muenster		e, h	1, 5
71. S. nyborg		e, h	1, 7
72. S. vejle		e, h	1, 2, 3
73. S. amager		y	1, 2, 3
74. S. zanzibar		k	1, 5
75. S. schangani		d	1, 5
76. S. meleagridis		e. h	1, w
77. S. lexington.		z ₁₀	1, 5
78. S. newington	III, XV	e, h	1, 6
79. S. selandia		e, h	1, 7
80. S. new brunswick		l, v	1, 7
81. S. illinois.		z ₁₀	1, 5
82. S. senftenberg	I, III, XIX	g, s, t	z ₆
83. S. niloese		d	
Groupes divers.			
84. S. aberdeen.	XI	i	1, 2, 3
85. S. rubislaw	XI	r	e, n, x
86. S. poona	XIII, XXII	z	1, 6
87. S. borbeck	XIII, XXII	l, v	1, 6
88. S. worthington	I, XIII, XXIII	l, w	z
89. S. wichita	I, XIII, XXIII	d	
90. S. habana	I, XIII, XXIII	f, g	
91. S. carrau	VI, XIV, XXIV	y	1, 7
92. S. onderstepoort.	(I), VI, XIV, XXV	e, (h)	1, 5
93. S. hvittingfoss	XVI	b	e, n, x
94. S. gaminara	XVI	d	1, 7

TYPE	ANTIGÈNE O	ANTIGÈNE H	
		Spécifique	Non spécifique
95. <i>S. kirkee</i>	XVII	<i>b</i>	1, 2
96. <i>S. cerro</i>	XVIII	z_6, z_{23}, z_{25}	
97. <i>S. kentucky</i>	(VIII), XX	?	z_6
98. <i>S. minnesota</i>	XXI, XXVI	<i>b</i>	<i>e, n, x</i>
99. <i>S. tel-aviv</i>	XXVIII	<i>y</i>	<i>e, n, z_{15}</i>
100. <i>S. ballerup</i>	XXIX, (Vi)	z_{14}	
101. <i>S. urbano</i>	XXX	<i>b</i>	<i>e, n, x</i>
102. <i>S. coli</i> 1.	XXXI, (Vi)		1, 5
103. <i>S. coli</i> 2.	XXXII		1, 5
104. <i>S. coli</i> 3.	IV, V, XII	z_{20}	
105. <i>S. coli</i> 4.	IV, (XXVII), XII	z_{21}	
106. <i>S. coli</i> 5.	(I), VI, XIV, XXV	z_{22}	
107. <i>S. arizona</i>	XXXIII	z_4, z_{23}, z_{26}	

le sérum para B : ces colonies représentent la phase spécifique ; elles possèdent le facteur H : *b* ; les autres colonies sont agglutinées par les deux sérums, c'est la phase non spécifique, possédant les facteurs antigéniques H : 1, 2 ; ces colonies seraient de même agglutinées par tous les immunsérums contenant les agglutinines H non spécifiques 1, 2 (voir tableau p. 7).

Une culture massive d'une souche paratyphique B venant d'être isolée compte habituellement les deux phases, côte à côte.

La lecture du tableau nous permet de voir que la majeure partie des souches du sous-groupe typhique ne se présente que sous la phase spécifique.

CHANGEMENT DE PHASE α - β .

Kauffmann [23, 27, 29] décrit dans la phase spécifique un certain changement de forme α - β . Cette notion ne semble pas avoir un intérêt pratique.

L'antigène H ne semble jouer aucun rôle dans le pouvoir vaccinant des bactéries et, de ce fait, son étude n'offre pas d'intérêt pour la préparation des vaccins ; par contre, il est nécessaire de connaître l'existence de ces différents facteurs H, pour l'identification d'un germe. En particulier, dans le cas où deux germes différents possèdent le même antigène O, seule la connaissance de facteurs H différents dans les deux germes permet l'identification.

ANTIGÈNE Vi.

Certaines souches lisses de bacilles typhiques possédant l'antigène O peuvent ne pas être agglutinées par des sérums anti-O. Cette inagglutinabilité O peut exister seule ou être accompagnée

d'inagglutinabilité H (pour les formes lisses immobiles ne renfermant pas d'antigènes H). L'existence de telles souches inagglutinables fut expliquée par la découverte, chez le bacille d'Eberth, d'un nouvel antigène, l'antigène Vi par Félix et Pitt [14, 15, 16, 17, 18].

On le considère comme un « antigène d'enveloppe » entourant le bacille et empêchant ainsi la fixation de l'agglutinine O. L'antigène Vi, antigène somatique, est mis en évidence à l'aide d'un sérum obtenu par injection au lapin de bacilles vivants, O inagglutinables. Le sérum, débarrassé par saturation de ses anticorps H et O, agglutine encore ces bacilles. L'antigène Vi, chauffé de 60° à 100°, perd la propriété d'agglutination en présence d'un sérum spécifique, mais il demeure antigénique, conservant le pouvoir d'engendrer des agglutinines, s'il est injecté à l'animal [15, 30]. Le milieu le plus favorable pour la conservation de l'antigène Vi est la gélose ascite molle, la température optima de développement de l'antigène Vi est 37°.

L'idée que l'antigène Vi était indispensable pour la virulence n'a pu être confirmée. Pour Kauffmann [24 bis], la présence d'antigène Vi chez le bacille paratyphique C, n'a aucun rapport avec la virulence : la souche Hirschfeld (sans Vi) est aussi virulente pour la souris que la souche East Africa (qui possède de l'antigène Vi). Nous avons maintes fois constaté que des souches sans Vi tuaient la souris à des doses moindres que des souches riches en Vi.

L'agglutination Vi est une agglutination somatique, polaire ; elle a un aspect granulaire.

Kauffmann [30] a particulièrement étudié les souches typhiques par rapport à cet antigène du point de vue sérologique. Il a montré que l'antigène Vi est toujours présent dans les souches fraîchement isolées et cette présence ne donne pas toujours une O inagglutinabilité. Nous avons nous-mêmes vérifié ces faits au cours de l'isolement de plusieurs centaines de souches.

Kauffmann distingue trois formes sérologiques :

— Forme V : l'antigène Vi y est très bien développé, elle est O inagglutinable.

— Forme W : sans antigène Vi, agglutinée par un sérum anti-O.

— Forme V-W : constituée par une association des formes V-W ; elle contient de l'antigène Vi, mais est agglutinée par un sérum anti-O.

FORMES	SÉRUM ANTI-O	SÉRUM ANTI-Vi
V	—	—
W	—	+
V-W	+	—
	+	+

L'agglutination H peut exister ou faire défaut dans chacune de

ces trois formes. L'importance sérologique du rôle joué par l'antigène Vi apparaît clairement. Il peut empêcher l'agglutination de certaines souches par un sérum anti-O. Si la souche ne renferme pas d'antigène H, elle sera à la fois O et H inagglutinable.

L'antigène Vi d'abord décrit par Felix et ses collaborateurs, chez le bacille d'Eberth, fut trouvé par Kauffmann chez le bacille paratyphique C [26]. Felix et Pitt [49] décrivent la présence dans les cultures de bacille paratyphique B d'un antigène ressemblant à l'antigène Vi. Pour Kauffmann [25], chez le bacille paratyphique B, le facteur O (V) serait l'antigène Vi.

En résumé, il existe des formes qui ne se différencient les unes des autres que sérologiquement, en particulier pour le bacille typhique, on peut avoir :

Forme HV, c'est-à-dire forme V avec antigène H contenant les antigènes H, O, Vi.

Forme OV, c'est-à-dire forme V sans antigène H contenant les antigènes O, Vi.

Forme HW, c'est-à-dire forme W avec antigène H contenant les antigènes O, H.

Forme OW, c'est-à-dire forme W sans antigène H contenant les antigènes O.

Forme HVW, c'est-à-dire forme VW avec antigène H contenant les antigènes HO, Vi + OH.

Forme OVW, c'est-à-dire forme VW sans antigène H contenant les antigènes O, Vi + O.

Les immunsérums OH, O et Vi sont des sérums idéaux qui agglutinent toutes les formes lisses ; pour Kauffmann, les formes inagglutinables ne se rencontrent plus.

Les sérums appelés par nous polyvalents (voir plus loin) sont des sérums OH (Vi).

La connaissance de ces différents antigènes, le nombre de facteurs décrits pour chacun d'eux, la lecture du tableau de Kauffmann-White, pourraient faire penser à ceux auxquels ces notions sont peu familières que la technique d'identification sérologique des *Salmonella* apparaît désormais, si elle est plus précise, beaucoup plus compliquée. Nous verrons qu'il n'en est rien, la possession de ces données nouvelles étant acquise.

D'ailleurs, si le tableau de Kauffmann-White, où sont relatées les caractéristiques antigéniques des différentes *Salmonella*, semble impressionnant, son usage n'est pas nécessaire pour leur identification.

Kauffmann lui-même utilise un tableau plus simple comprenant 6 sérums anti-O, 12 sérums anti-H spécifique, et 2 sérums anti-H non spécifique.

Boecker [3, 4] simplifie encore n'utilisant que 9 sérums.

En résumé, l'existence de plusieurs types de facteurs antigéniques chez les *Salmonella*, entraîne, pour l'identification de ces germes, l'emploi de sérums étalons agglutinants possédant à la fois ou séparément les anticorps correspondants.

D'après Kauffmann.

		AGGLUTININES correspondant à l'antigène
<i>Sérums anti-O :</i>		
Paratyphique A		I, II
Paratyphique B		IV, V
Paratyphique C		VI, VII
Souche Newport		VI, VIII
Gärtner		IX
London.		III, X
<i>Sérums anti-H spécifique :</i>		
Para A spécifique		<i>a</i>
Para B Schottmuller spécifique.		<i>b</i>
Typhi murium.		<i>i</i>
Para C spécifique		<i>c</i>
Thompson spécifique.		<i>k</i>
Virchow spécifique.		<i>r</i>
Oranienburg spécifique.		<i>m, t</i>
Bareilly spécifique		<i>g</i>
Newport spécifique.		<i>e, h</i>
Typhi R		<i>d</i>
Enteritidis		<i>g, o, m</i>
London.		<i>l, v</i>
<i>Sérums anti-H non spécifique :</i>		
S. typhi murium, var. binns.		1, 2, 3
S. cholerae suis, var. kuzendorf.		1, 3, 4, 5

D'après Kauffmann, *Ergebnisse der Hygiène*, 1934, — 45, — 249.

D'après Böcker.

SÉRUMS	AGGLUTININES		
1. Para A	I, II	<i>a</i>	
2. Para B	IV, V	<i>b</i>	1, 2, 3
3. Breslau	IV, V	<i>i</i>	1, 2, 3
4. Suipestifer non spécifique.	VI, VII		1, 3, 4, 5
5. Amerika.	VI, VII	<i>c</i>	1, 3, 4, 5
6. Newport	VI, VII	<i>e, h</i>	1, 2, 3
7. S. typhi.	IX	<i>d</i>	
8. Gärtner lena	IX	<i>g, o, m</i>	
9. London	III, X	<i>l, v</i>	1, 4, 6

Nous allons maintenant décrire la technique que nous utilisons : la préparation des différents sérums agglutinants, le protocole expérimental et les résultats obtenus.

Préparation des sérums étalons agglutinants.

Avant toute injection, les lapins sont saignés et leur sérum testé vis-à-vis des émulsions étalons. Nous avons constaté sur 200 lapins, un taux d'agglutination de :

1/200 pour quelques-uns d'entre eux (qui furent éliminés) ; chez la plupart des lapins, le taux des agglutinines naturelles oscillait entre 1/20 et 1/40.

I. — SÉRUMS POLYVALENTS (1). — Ces sérums sont préparés, par injection à des lapins, d'émulsions de bacilles vivants : bacille d'Eberth (ou bacilles paratyphiques A, B ou C) possédant les antigènes suivants :

SOUCHES MICROBIENNES	ANTIGÈNES			
	O	Vi	H Spécifique	H Non spécifique
Bacille d'Eberth	IX	+	<i>d</i>	—
Bacille paratyphique A.	I, II		<i>a</i>	—
Bacille paratyphique B.	IV, V		<i>b</i>	1, 2
Bacille paratyphique C	VI, VII	+	<i>c</i>	1, 5

La teneur en antigène somatique O (XII) de ces souches doit être nulle ou négligeable, de façon à supprimer ou à réduire au minimum le phénomène de coagglutination.

Le protocole suivi est le même pour les différents germes.

Une colonie isolée, de la souche sélectionnée, est ensemencée sur gélose inclinée, mise à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures. La culture obtenue est émulsionnée dans l'eau physiologique, centrifugée. On évite ainsi l'apparition éventuelle dans les immunsérums d'anticorps antigélose, non spécifiques, dont la présence provoque une agglutination non spécifique [44]. Le culot, repris par de l'eau

(1) Nous entendons par sérum polyvalent, un sérum obtenu par injection à l'animal d'un germe vivant donné. Ce germe possédant plusieurs types d'antigènes, on retrouve dans le sérum les anticorps correspondants, par exemple : le sérum anti-Eberth, préparé par injection au lapin d'un bacille d'Eberth vivant, antigéniquement complet, renferme des agglutinines anti-H, anti-O et anti-Vi.

Par opposition, nous parlons de sérums anti-H, anti-O, anti-Vi, lorsque nous avons obtenu, par des procédés convenables, l'élimination de certaines agglutinines et que le sérum ainsi dénommé ne renferme plus qu'un seul type d'agglutinines.

physiologique, est émulsionné à nouveau. La teneur en corps microbiens est ramenée à 1 milliard au centimètre cube (2).

1 c. c. de cette émulsion de germes vivants est injecté dans la veine marginale de l'oreille du lapin.

Six jours plus tard, on injecte 1 c. c. d'une émulsion dont la teneur microbienne est de 2 milliards au centimètre cube ; une troisième injection est faite, de nouveau après six jours, de 1 c. c. d'une émulsion de 4 milliards.

Quatre jours après la troisième injection, une saignée d'essai est pratiquée, le taux d'agglutination du sérum vis-à-vis de la souche homologue, recherché ; il est au moins de 1/25.000 (avec les souches de bacille paratyphique A, le taux obtenu est quelquefois plus bas).

Si un lapin donne un taux insuffisant, une nouvelle injection de 1 c. c. à 4 milliards de germes vivants par centimètre cube est faite, une saignée d'essai répétée. Lorsque le taux d'agglutination est convenable, l'animal est saigné à blanc, le sérum, après avoir été titré, est réparti en ampoules ou flacons.

II. — SÉRUMS NE POSSÉDANT QU'UN SEUL TYPE D'AGGLUTININES. — A. *Bacille d'Eberth*. — a) *Sérum anti-H*. — Le sérum anti-H est préparé par injection au lapin :

1° De la souche H 901 vivante, qui contient peu d'antigène O.

2° Ou de toute souche typhique mobile étalonnée par une agglutination préalable, pour sa teneur en antigène H.

La technique suivie est celle décrite précédemment, sauf en ce qui concerne le séjour de la culture à l'étuve à 37° qui est de 8 heures seulement [30].

Le sérum obtenu est saturé par la souche O 901, ou toute autre souche H inagglutinable, pour éliminer les agglutinines O.

Technique de saturation. — Onensemence 4 boîtes de Roux avec une souche O ; après vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, la culture est recueillie dans de l'eau physiologique, centrifugée ; le culot est repris par de l'eau physiologique, émulsionné à nouveau, chauffé deux heures à 100°, puis centrifugé. Ce culot est alors émulsionné avec 1 c. c. de sérum de lapin dilué au 1/20 (sérum dont le taux des agglutinines est voisin de 1/25.000), le mélange est placé deux heures à l'étuve à 37°, puis abandonné vingt heures à la glacière. Après centrifugation, on recueille le sérum et on vérifie, à l'aide d'une émulsion O, si la saturation est totale ; sinon, l'opération sera répétée, le sérum ne contiendra finalement que des agglutinines H : d.

b) *Sérum anti-O*. — Le sérum est préparé par injection au lapin d'une émulsion chauffée de la souche O 901 ou de toute autre souche lisse. La souche convenable est ensemencée sur boîte de Roux, mise à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures ; on recueille la culture

(2) La détermination est faite à l'aide de l'électro-photomètre de Meunier. Nous disposons de courbes étalons, établies après numération, au microscope, d'une émulsion microbienne. La cellule employée par nous est la cellule compte-microbes d'Helber-Glynn, de 20 μ de profondeur.

dans de l'eau physiologique, on centrifuge, puis reprise du culot par de l'eau physiologique, chauffage deux heures à 100° ; nouvelle centrifugation, avec reprise du culot par de l'eau physiologique, par deux fois.

Le taux final est ramené à 1 milliard de germes au 1 c. c. Le lapin reçoit 1 c. c. dans la veine marginale de l'oreille.

Deuxième injection, 1 c. c. d'une émulsion à 2 milliards.

Troisième injection, 1 c. c. d'une émulsion à 4 milliards dans les mêmes intervalles de temps que précédemment. La saignée d'essai donne un titre moyen de 1/6.400.

Saturation. — Les agglutinines H, si elles existent, sont éliminées par saturation du sérum à l'aide de bacilles vivants (culture de huit heures sur gélose de la souche H 901). Les bacilles sont émulsionnés directement dans le sérum dilué au 1/10 ; on procède ensuite comme pour le sérum anti-H.

Le sérum ne doit plus contenir que des agglutinines anti-O (IX).

D'autres techniques sont préconisées par leurs auteurs : Kauffmann utilise un milieu à l'œuf, favorable au développement de l'antigène O. Les cultures obtenues sur ce milieu sont recueillies et l'émulsion, après un chauffage de 2 heures à 100°, est injectée à des lapins. Nous n'avons pu, ces dernières années, expérimenter ce milieu à l'œuf. Le Chuiton [33] émulsionne les bacilles dans l'huile d'olive neutre ; après un certain temps les bacilles ont perdu leur antigène H. Les lapins reçoivent cette émulsion huileuse ; il y aurait, dans le sérum, apparition d'anticorps O.

c) *Sérum anti-Vi.* — Le lapin reçoit des émulsions de la souche Ty₂ ou Watson, ou Vi 1. La souche est ensemencée sur gélose ascite et mise vingt-quatre heures à l'étuve à 37°. L'émulsion recueillie est lavée à deux reprises dans de l'eau physiologique, centrifugée. La teneur en microbes est ajustée de telle sorte que :

A la première injection, le lapin reçoive 1 c. c. d'une émulsion renfermant 100 millions de germes vivants.

Deuxième injection, 1 c. c. d'une émulsion renfermant 200 millions de germes vivants.

Troisième injection, 1 c. c. d'une émulsion renfermant 400 millions de germes vivants.

Saignée d'essai. Le titre doit osciller entre 1/800 et 1/1.600 ; sinon, une injection supplémentaire est pratiquée.

Saturation. — Comme pour le sérum anti-O, à l'aide de bacilles vivants de la souche H 901, pour priver le sérum de ses agglutinines H et O.

Le sérum ne possède que des agglutinines anti-Vi.

B. *Bacille paratyphique A.* — a) *Sérum anti-H.* — Il est préparé, comme pour le bacille d'Eberth, par injection au lapin d'une souche vivante, mobile, lisse, de bacille paratyphique A, après culture de huit heures à l'étuve à 37°. Le sérum obtenu est saturé par une émulsion de bacille paratyphique A, chauffée deux heures à 100° pour éliminer les agglutinines O. Il possède les agglutinines H : a.

b) *Sérum anti-O.* — Comme pour le bacille d'Eberth. Culture de

vingt-quatre heures à 37° d'une souche de bacille paratyphique A ; l'émulsion est chauffée deux heures à 100°, puis injectée.

Saturation. — Par une émulsion de bacilles vivants, après huit heures de culture à 37°. Le sérum anti-O possède les agglutinines I, II.

C. Bacille paratyphique B. — Même protocole.

Le sérum anti-H, obtenu à partir d'une souche de paratyphique B diphasique, possède les agglutinines : b, 1, 2.

Le sérum anti-O, les agglutinines IV et V.

D. Bacille paratyphique C. — Même protocole.

Le sérum anti-H possède les agglutinines : c, 1, 5.

Le sérum anti-O, les agglutinines VI, VII.

Technique.

Méthode d'agglutination sur lame. — Nous utilisons des lames de verre, parfaitement dégraissées et propres, de 5 cm. sur 15 cm. en moyenne. Elles offrent l'avantage de permettre l'étude du germe en cause vis-à-vis de plusieurs sérums, et de comparer facilement les types d'agglutination obtenus.

Une goutte de sérum étalon, convenablement dilué (3), y est déposée ; puis on émulsionne avec l'anse une parcelle de la colonie à identifier ; on regarde à l'œil nu ou à l'agglutinoscope.

On vérifie, au préalable, que la souche, microbienne, émulsionnée dans de l'eau physiologique, ne s'auto-agglutine pas.

A. Une goutte de chacun des sérums polyvalents : anti-Eberth, anti para A, B et C est déposée sur la lame ; une parcelle de la colonie à identifier y est émulsionnée.

a) Une agglutination apparaît avec l'un des sérums : elle est immédiate, floconneuse (l'agglutination H est prédominante), éclaircissant complètement le liquide : le germe est identifié. Il doit y avoir concordance entre le résultat de l'agglutination et celui obtenu par l'étude des propriétés biochimiques du germe.

b) L'agglutination est tardive (se manifestant entre cinq et vingt minutes), granulaire ; le germe inconnu possède un antigène O commun avec la souche qui a servi à préparer l'immunsérum ; mais son antigène H est différent. Connaissant ce facteur O, on émulsionne le germe à identifier dans différents sérums anti-H préparés à partir de souches ayant l'antigène O commun. Une agglutination apparaît avec l'un des sérums. Le germe dont on a ainsi déterminé l'antigène O et l'antigène H, est identifié.

c) Le mélange reste opaque, trouble ; au bout de quelques minutes, une agglutination partielle, floconneuse apparaît. Le germe étudié possède un facteur H commun avec celui qui a servi à préparer l'immunsérum, mais leur antigène O est différent.

(3) Le taux de dilution est mentionné pour chaque sérum. Les sérums dilués peuvent être conservés à la glacière pendant trois mois au maximum.

On opère comme dans le cas *b* en plaçant le germe en présence de différents sérums anti-O.

Pour la grosse majorité des souches, nous nous sommes trouvés en présence du cas *a*. Ainsi, avec un jeu de quatre sérums, le laboratoire peut rapidement poser un diagnostic. Nous insistons sur le fait que le test d'agglutination doit être complété par l'étude des réactions biochimiques. Une discordance entre les deux méthodes ne doit pas faire penser, en premier lieu, à une erreur de

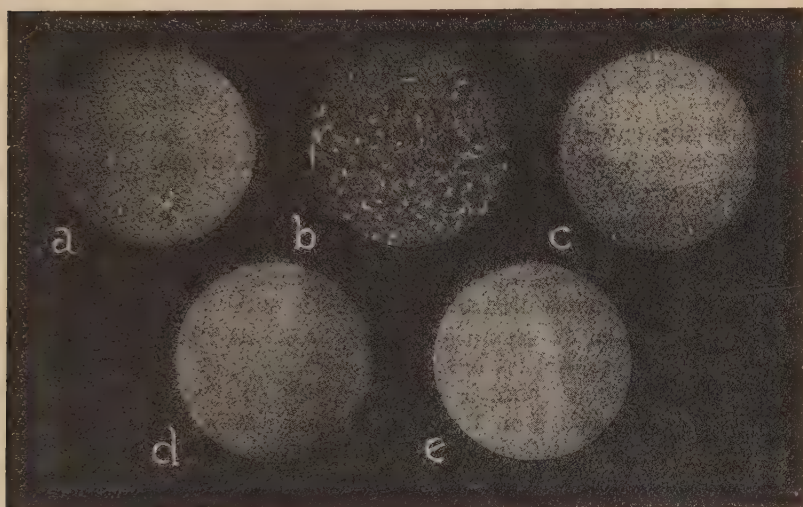


FIG. 1. — Diagnostic sérologique des souches de *Salmonella*. *a*, parcelle de la colonie, émulsionnée dans un sérum polyvalent : il y a prédominance des caractères de l'agglutination H : gros agglutinats floconneux; on perçoit aussi des grains plus petits dus à l'agglutination O [ou Vi : le liquide ambiant est totalement éclairci; *b*, en présence d'un sérum anti-H : gros agglutinats floconneux; *c*, en présence d'un sérum anti-O : petits agglutinats à grains très fins; *d*, en présence d'un sérum anti-Vi : même aspect d'agglutination granulaire; *e*, témoin : parcelle de la colonie émulsionnée dans de l'eau physiologique.

technique, mais doit attirer l'attention sur la possibilité de se trouver en présence des cas *b* et *c*.

B. Le germe identifié, si l'on désire étudier sa composition antigénique :

1° Une parcelle de la colonie est émulsionnée dans les sérums anti-H, anti-O, anti-Vi, correspondant au germe en cause.

On vérifie ainsi la présence ou non des différents types d'antigènes.

Nous présentons ci-dessus les aspects des agglutinations lorsqu'une souche est mise en présence de différents anti-sérums (fig. 1).

2° Si l'on dispose d'un jeu complet de sérums agglutinants, ne possédant plus qu'un seul anticorps, on détermine complètement la structure antigénique du germe.

Prenons un exemple :

Nous avons identifié un bacille paratyphique B. Nous émulsionnons une parcelle de la culture dans une goutte de sérum :

Anti-O (IV) : s'il y a une agglutination, le para B renferme le facteur IV.

Anti-O (V) : s'il y a une agglutination, le para B renferme le facteur V.

Anti-O 901 : s'il y a une agglutination, le para B renferme le facteur XII.

Anti-H 22 Copenhague : s'il y a une agglutination, le para B renferme le facteur b.

Anti-H (1, 2 non spécifique) : s'il y a une agglutination, le para B renferme le facteur 1, 2.

Le sérum anti-O (IV) est préparé, par injection au lapin d'une émulsion de la souche S. reading, après un chauffage de 2 heures à 100°, selon la technique générale décrite (4).

Le sérum anti-O (V) est obtenu par saturation, à l'aide de la souche S. essen, ne renfermant que le facteur IV, d'un sérum préparé par injection au lapin d'une émulsion tuée d'une souche paratyphique B possédant les facteurs IV et V.

La préparation du sérum anti-O 901 a été décrite plus haut. La souche O 901 possède les facteurs IX et XII. Nous tirons d'ailleurs parti de l'existence, chez la souche O 901, du facteur XII, pour rechercher, à l'aide d'un sérum préparé à partir de cette souche, la présence, chez les différentes *Salmonella*, du facteur antigénique XII.

Nous avons utilisé le sérum anti-H 22 de Copenhague pour la recherche du facteur b.

Le sérum anti-H, non spécifique [1, 2] est préparé à partir de la souche paratyphique B non spécifique 5.706 de Londres. Nous avons utilisé une émulsion de bacilles vivants, à partir d'une culture de 8 heures à l'étuve à 37°.

Méthode à l'étuve à 37°. — Une souche microbienne identifiée, nous utilisons cette technique pour déterminer son taux limite d'agglutinabilité vis-à-vis des différents sérums étalons. Les souches ainsi étudiées sont éventuellement utilisées pour la préparation de vaccins ou d'immunsérums.

Nous préparons, tout d'abord, des dilutions croissantes des différents sérums étalons, selon le protocole suivant :

Dans un premier tube, on introduit 0,1 c. c. de sérum étalon ; on dilue au 1/10 par addition de 0,9 c. c. d'eau physiologique ; après

(4) La souche S. essen pourrait être également utilisée, ou toute souche paratyphique B ne possédant que le facteur IV.

	TUBE 1	TUBE 2	TUBE 3	TUBE 4
Sérum.	0,1 c. c.	0,5, tube 1.	0,5, tube 2.	0,5, tube 3.
Eau physiologique.	0,9	0,5	0,5	0,5
Dilution du sérum.	1/10	1/20	1/40	1/80

avoir bien mélangé, 0,5 c. c. du contenu du premier tube est porté dans un second et complété à 1 c. c. par addition d'eau physiologique, le sérum est alors dilué au 1/20 ; l'opération se poursuit, identique, pour les tubes suivants.

0,1 c. c. du sérum dilué au 1/10 est introduit dans un tube, le volume est porté à 1 c. c. par addition de l'émulsion microbienne en cause (5), la dilution finale du sérum est de 1/100.

0,1 c. c. au 1/20 est dilué au 1/200, etc.

Un tube témoin contient seulement l'émulsion microbienne dans de l'eau physiologique ; le contenu de ce dernier tube ne doit pas présenter d'agglutination à la fin de l'opération.

On porte à l'étuve à 37°. La lecture pour l'agglutination H (agglutination de la souche par le sérum anti-H étalon), se fait à l'œil nu ou à l'agglutinoscope dès la sortie de l'étuve, après deux heures de séjour 37°. Les tubes ne doivent pas être secoués. Dans tous les tubes où l'agglutination est totale, les agglutinats floconneux sont en suspension dans la partie inférieure du tube, le liquide au-dessus est parfaitement clair. Lorsque le pouvoir agglutinant du sérum arrive à la limite, il y a encore une agglutination visible, mais le liquide ambiant reste trouble.

L'agglutination O exige un séjour de deux heures à l'étuve à 37° et vingt heures à la température du laboratoire. Les tubes peuvent être agités : l'agglutination a un aspect granulaire, les petits agglutinats se trouvant disposés dans toute la hauteur du tube. Une première lecture se fait à la sortie de l'étuve ; une seconde, après vingt heures de séjour à la température du laboratoire.

Agglutination microscopique. — L'agglutination H montre une immobilisation des germes ; l'agglutination O, un accolement polaire.

Le procédé est sensible, mais nécessite l'emploi de bacilles très mobiles, difficiles à entretenir en culture.

Nous ne l'utilisons pas. Kauffmann lui-même le considère comme inférieur à l'agglutination sur lame pour la pratique.

(5) La teneur microbienne de l'émulsion doit être de 400 à 500 millions de germes au centimètre cube.

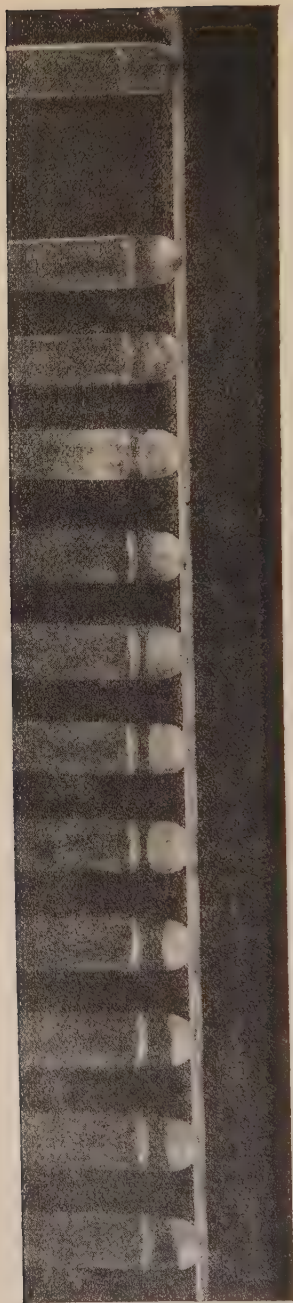


FIG. 2. — Agglutination type H. Dans les premiers tubes, l'agglutination est totale; les agglutinats floconneux sont surmontés d'une zone liquidienne claire; les deux derniers tubes présentent encore une agglutination partielle; dans le tube témoin, isolé, aucune agglutination.

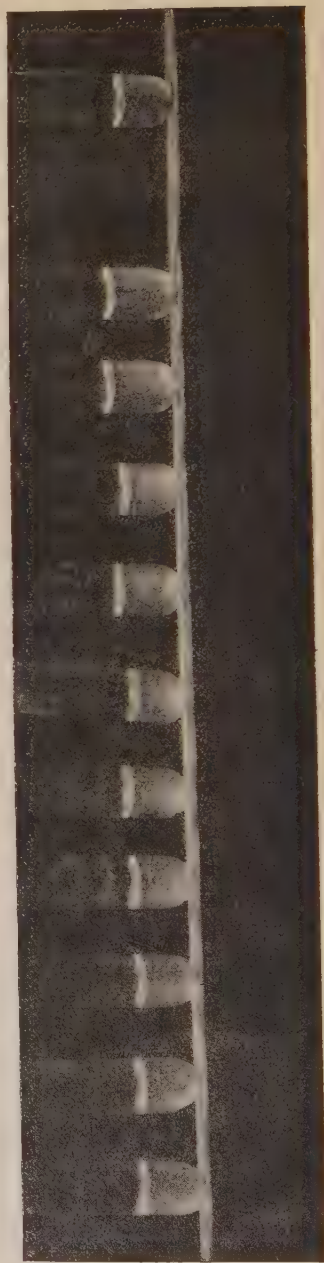


FIG. 3. — Agglutination type O. La réaction, positive dans les sept premiers tubes, est encore partielle dans le huitième; dans les neuvième et dixième tubes, et le témoin, elle est négative.

Résultats.

Nous avons examiné au cours de ces dernières années 212 souches. Une étude complète en a été faite, en vue de leur sélection pour la préparation de nos vaccins, ou la préparation des émulsions microbiennes utilisées dans la technique du séro-diagnostic. Nous ne discutons pas ici de la valeur du facteur antigénique O (XII) commun à toutes les *Salmonella*, en tant que facteur immunisant. Si sa présence est admise chez les souches devant servir à préparer les vaccins, elle doit faire renoncer à l'emploi de toute souche qui le possède pour la préparation des émulsions microbiennes pour le séro-diagnostic.

La majorité de ces souches provenait de l'Hôpital Pasteur ; d'autres nous ont été adressées de différentes régions en vue de leur identification.

Nous ne rapportons ici que les résultats donnés par l'examen sérologique.

Nous avons étudié :

151 souches de bacille d'Eberth. Toutes contenaient, lors de leur isolement, les antigènes O (IX) H (d) et Vi. Au cours des repiquages successifs, certaines subirent des transformations morphologiques et antigéniques. Nous rappelons ici toute l'importance du choix des milieux pour l'entretien et la conservation des souches.

56 souches de bacille paratyphique B. Sur 23 de ces souches, dont nous avons recherché l'équipement antigénique, une seule ne possédait que le facteur O (IV) ; toutes les autres avaient les facteurs IV et V. Boivin [41], sur 44 souches étudiées, a trouvé 5 souches possédant seulement le facteur IV.

4 souches de bacille paratyphique A ; toutes possédaient les facteurs I et II ; nous signalons que l'une d'elles est immobile, ne possède pas de facteur H : a.

1 seule souche de paratyphique C, avec les facteurs VI et VII.

Discussion.

Si l'on examine à nouveau le tableau de Kauffmann, on constate que cet auteur utilise un jeu de 6 sérums anti-O. Ce sont ceux qui correspondent aux antigènes des souches le plus fréquemment rencontrées.

Nous-mêmes, possédons les sérums anti-O ci-dessous :

SÉRUM ANTI-	POSSÉDANT LE FACTEUR O
Eberth	IX
Para A	I, II
Para B	IV, V
Para C	VI, VII
Newport	VI, VIII

Toutes les souches qui nous ont été soumises, purent être identifiées à l'aide de ces seuls sérums.

Nous utilisons les sérums anti-H suivants :

SÉRUM ANTI-	POSSÉDANT LE FACTEUR	
	H spécifique	Non spécifique
Eberth	<i>d</i>	
Para A	<i>a</i>	
Para B	<i>b</i>	1, 2
Para C	<i>c</i>	1, 5
Enteritidis Gärtner var. Danysz	<i>g, m</i>	
Aertrycke	<i>i</i>	1, 2, 3
Para B non spécifique.		1, 2

Les autres sérums anti-H proposés par Kauffmann, sont :

k correspondant à la souche Thompson.

r correspondant à la souche Virchow.

m, t correspondant à la souche Oranienburg.

y correspondant à la souche Bareilly.

e, h correspondant à la souche Newport.

Toutes ces souches rentrent dans le sous-groupe du bacille paratyphique C ; elles possèdent en commun le facteur antigénique O (VI), et le facteur antigénique H non spécifique 1. Elles peuvent être identifiées comme appartenant au sous-groupe para C, grâce à notre sérum anti-para C polyvalent. L'emploi de ce sérum permet simplement de poser le diagnostic d'infection à *Salmonella* du sous-groupe para-C. Le clinicien s'en contente généralement.

Mais l'identification exacte du germe peut être importante, parce que posant certains problèmes épidémiologiques. Elle peut être terminée par un laboratoire possédant un jeu complet de sérums agglutinants. Encore faut-il compléter l'examen sérologique du germe par l'étude de ses propriétés biochimiques, étude sur la nécessité de laquelle nous avons insisté à plusieurs reprises. Sohier et Henry [43] rapportant deux cas d'infection à *Salmonella*, dus au bacille paratyphique C, après détermination de la structure antigénique, ont posé le diagnostic d'espèce par les caractères biochimiques des germes étudiés. La lecture du tableau de Kauffmann (p. 7) montre en effet que plusieurs espèces de bacille paratyphique C possèdent la même structure antigénique. Ces espèces sont différenciables seulement par leurs caractères biochimiques.

Sedaïllan [39] et ses collaborateurs ont examiné un nombre important de souches isolées dans la région lyonnaise.

Leurs conclusions sur l'intérêt de l'identification sérologique d'une souche, sur le choix des souches à utiliser pour la prépa-

ration des vaccins, sont en accord avec l'opinion générale. L'identification sérologique présente aussi un grand intérêt épidémiologique.

Certains de leurs résultats ne concordent pas avec ceux de Kauffmann, ni avec les nôtres. Alors que ce dernier auteur et nous-mêmes avons constamment constaté la présence de l'antigène Vi (voir p. 10), Sedaïllan et ses collaborateurs n'ont trouvé cet antigène présent que chez une seule souche d'Eberth.

Ces auteurs ont, dans un certain nombre de cas, mis en évidence seulement l'antigène H ; ce fait est curieux. Des cultures de ces souches, émulsionnées et chauffées deux heures à 100°, puis mises en présence d'un sérum anti-O pur, doivent être agglutinées et révéler l'existence d'antigène somatique O. Dans d'autres cas, le diagnostic sérologique n'a révélé que l'antigène O. Il pourrait évidemment s'agir de souches O pures, immobiles, non ciliées ; or, de telles souches sont extrêmement rares. Les auteurs pensent plutôt, dans ces cas, être en présence de bacilles de Gärtner, ce germe ayant en commun, avec le typhique, le facteur O (IX). Mais, si les souches sont mobiles, le diagnostic sera posé aisément par l'emploi des deux sérums anti-H : *d*-Eberth et *gm*-Gärtner, ce dernier seul agglutinant la souche. On peut aussi recourir à l'étude des propriétés biochimiques qui sont différentes pour les deux germes. Il n'est point besoin de faire appel au séro-diagnostic qui dans le cas cité (cas 1283) a consisté à éprouver le sérum du malade vis-à-vis d'émulsions anti-H et anti-O éberthiennes, et d'une émulsion de paratyphique B, dont on ne saisit pas l'utilisation. Certaines observations (1316 par exemple), relatent une constitution antigénique anormale de la souche qui serait IV, IX *a*, *d*. Les auteurs ne mentionnent pas les propriétés biochimiques du germe. Mais il faut savoir, et Kauffmann [29 bis] le relate, et le montre clairement dans un tableau détaillé, que l'utilisation des sérums anti-O non saturés laisse subsister la possibilité de coagglutination. Kauffmann donne les chiffres suivants : une souche typhique qui est agglutinée par un sérum anti-O (IX) au 1/1.320, l'est également par un sérum anti-O (IV) au 1/280. Des bacilles paratyphiques B sont coagglutinés par un sérum anti-O éberthien. Nous avons constaté nous-mêmes le même phénomène : une souche de bacille paratyphique B est agglutinée par le sérum (I, II) de Kauffmann ; on ne peut cependant dire que sa structure antigénique est I, II, IV, V. Ces faits sont dus à la présence du facteur de groupe XII.

Le même facteur XII peut être une cause de coagglutination avec des sérums anti-H. Ainsi, une souche de bacille paratyphique B est agglutinée par le sérum anti-H *a* (paratyphique A) de Kauffmann ; elle n'a pas la formule antigénique *b*, *a*. Il faut savoir que les sérums anti-H de Kauffmann sont préparés par injection à des lapins, d'émulsions formolées, où l'antigène O est entravé. Il n'en persiste pas moins que les sérums obtenus peuvent posséder une

petite quantité d'anticorps O et si les germes au départ, avaient le facteur XII, l'anticorps engendré par ce dernier facteur sera cause de coagglutination imputée à tort à d'autres facteurs.

La connaissance de ces phénomènes peut expliquer les formules antigéniques complexes signalées par Sedaïllan.

Un peu plus loin, ce même auteur attribue à certains germes classés dans le groupe paratyphique B. la formule IV, V, *b*, *i* ; cela peut être dû à l'emploi de sérums anti-H non spécifiques, possédant en commun les facteurs 1, 2, et en propre, pour le sérum anti-paratyphique B, le facteur *b*, et, pour le bacille d'Aertrycke, le facteur *i*. L'emploi de sérums spécifiques doit permettre d'identifier complètement le germe, ce que reconnaît d'ailleurs l'auteur qui n'a pas poussé l'identification à fond. De même, les sérums anti-H possédant les anticorps *l*, *v* peuvent encore avoir en commun avec le sérum anti-paratyphique B, les anticorps non spécifiques 1, 2. Nous pouvons encore relever (cas 1.056 et 394) des souches ayant une formule complexe (IX, Vi, *gp*, *gq*, *gm*) et (IX, *fg*, *gm*, *gp*, *gq*). Les auteurs disent justement que ces germes appartiennent à la variété *enteritidis*, ou Dublin, ou Moskow, mais ajoutent qu'il n'est pas possible de préciser ; or, l'emploi de sérums saturés peut résoudre le problème.

Nous arrêterons là nos remarques, et nous dirons, partant d'une colonie isolée : on ne peut affirmer l'existence de facteurs spécifiques, dans les cas complexes, que par l'utilisation de sérums agglutinants bien connus, chez lesquels on a vérifié, au préalable, l'absence d'anticorps de groupe, et qui ont été saturés, au besoin. Il est également nécessaire de déterminer les caractères biochimiques qui, seuls, peuvent permettre, parfois, un choix entre deux germes, ainsi que l'a dit maintes fois Kauffmann, et dont Sohier avait tiré fort justement parti dans l'étude précédemment citée.

Nous ne nous étendrons pas longuement sur le récent travail de Violle et Nabonne [45], fort intéressant, par ailleurs, mais pour lequel, ce qui nous intéresse ici étant l'identification sérologique des souches, nous formulerons les mêmes objections. Pour une souche isolée, la formule antigénique établie a été O = IV, V, VI, VIII, III, XXVI ; H = *b*, *c*. Une dissociation de la culture a permis aux auteurs de montrer l'existence de deux germes différents, un bacille paratyphique B ayant la formule IV, V, *b*, et un bacille paratyphique C, VI, VIII *c*. Le tableau de Kauffmann déjà cité [29 bis], montre que ce dernier bacille peut être agglutiné par un sérum renfermant l'anticorps III.

Quant aux germes isolés à la Ciotat, il a pu y avoir chez le malade, infection à la fois par un bacille d'Eberth et un Gärtner. Il n'est pas fait mention de l'étude des caractères biochimiques des souches isolées, étude qui aurait pu éclaircir le problème.

En résumé, nous utilisons une technique simple et essentielle-

ment pratique d'identification sérologique d'une souche de *Salmonella*. A l'aide d'un jeu de 4 sérums polyvalents, nous pouvons déceler, par une interprétation facile de la réaction, si le germe inconnu appartient à l'une des quatre souches homologues, ou bien, s'il n'a en commun qu'un des types d'antigènes. Il reste alors, par l'emploi de sérums plus spécifiques, à compléter cette détermination. Elle est aidée, dans certains cas, par la connaissance de ses propriétés biochimiques. Ce dernier examen doit toujours être pratiqué.

On pourrait également, dans la plupart des cas, classer un germe comme *Salmonella* (sauf certains bacilles du sous-groupe de Eberth et le paratyphique A, qui existent toujours sous la forme nonophasique spécifique) en émulsionnant la colonie suspecte dans un sérum anti-H non spécifique. Il resterait ensuite à déterminer quelle est la *Salmonella* en cause.

Le germe identifié, son équipement antigénique est important à connaître dans certains cas : souches destinées à la préparation des vaccins, des émulsions pour le séro-diagnostic ; intérêt de la connaissance de la structure de ces souches lors d'une enquête épidémiologique. Cette détermination nécessite l'usage de sérums agglutinants plus spécifiques, ne possédant plus qu'un seul anticorps. On identifie les différents facteurs antigéniques par le jeu de réactions d'agglutinations croisées, et à l'aide de sérums saturés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDREWES (F. W.), *J. Path. a. Bact.*, 1922, **25**, 505.
- [2] ARKWRIGHT (J. A.), *J. Path. a. Bact.*, 1921, **24**, 36.
- [3] BOECKER (E.), *Zentralbl. Bakt. I orig.*, 1936, **137**, 321.
- [4] BOECKER (E.), *Zentralbl. Bakt. I orig.*, 1937, **139**, 167.
- [5] BOIVIN (A.), MESROBEANU (I.) et MESROBEANU (L.), *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 307.
- [6] BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.), *Rev. Immunol.*, 1935, **1**, 553.
- [7] BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.), *C. R. Acad. Sci.*, 1934, **198**, 2211 ; *Rev. Immunol.*, 1936, **2**, 113.
- [8] BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.), *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 752 ; *Rev. Immunol.* 1938, **4**, 197.
- [9] BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.), *Ces Annales*, 1938, **61**, 426.
- [10] BOIVIN (A.), *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 487.
- [11] BOIVIN (A.) *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1139.
- [12] CARLINFANTI (E.), *Boll. Ist. Sier. Mil.*, 1941, **20**, 367 ; cité d'après KAUFFMANN. Voir réf., 32.
- [13] CRAIGIE (J.), *J. Immunol.*, 1931, **21**, 417.
- [14] FELIX (A.) et PITT (R. M.), *Lancet*, 1934, vol. **2**, 186.
- [15] FELIX (A.), BHATNAGAR (S. S.) et PITT (R. M.), *Brit. J. exp. Path.*, 1934, **15**, 346.
- [16] FELIX (A.), BHATNAGAR (S. S.) et PITT (R. M.), *Brit. J. exp. Path.*, 1935, **16**, 422.

- [17] FELIX (A.), KRIKORIAN (K. S.) et REITLER (R.), *J. Hyg.*, 1935, **35**, 421.
- [18] FELIX (A.) et PITT (R. M.), *J. Hyg.*, 1935, **35**, 428.
- [19] FELIX (A.) et PITT (R. M.), *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 81.
- [20] HORNUS (G.), *Rev. Immunol.*, 1935, **1**, 488.
- [21] HORNUS (G.) et BAUDOUY (C.), *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1288.
- [22] HORNUS (G.) et BAUDOUY (C.), *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 634.
- [23] KAUFFMANN (F.) et MITSUI (Ch.), *Zeitschr. f. Hyg.*, 1930, **111**, 740.
- [24] KAUFFMANN (F.), *Erg. der Hyg.*, 1934, **15**, 219.
- [24 bis] KAUFFMANN (F.), *Zeitschr. f. Hyg.*, 1936, **117**, 778.
- [25] KAUFFMANN (F.), *Zeitschr. f. Hyg.*, 1936, **118**, 318.
- [26] KAUFFMANN (F.), *Zeitschr. f. Hyg.*, 1935, **116**, 617.
- [27] KAUFFMANN (F.), *Zeitschr. f. Hyg.*, 1937, **119**, 103.
- [28] KAUFFMANN (F.), *Zeitschr. f. Hyg.*, 1937, **119**, 356.
- [29] KAUFFMANN (F.) et TESDAL (M.), *Zeitschr. f. Hyg.*, 1937-1938, **120**, 168.
- [29 bis] KAUFFMANN (F.), *Communic. Inst. Séroth. Etat Danois*, 1940, **30**, 278.
- [30] KAUFFMANN (F.), *Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe : Einer Munksgaard, édit., Copenhagen*, 1941.
- [31] KAUFFMANN (F.), *Communic. Inst. Séroth. Etat Danois*, 1942, **32**, 127.
- [32] KAUFFMANN (F.), *Communic. Inst. Séroth. Etat Danois*, 1942, **32**, 523.
- [33] LE CHUITON (F.), BIDEAU (J.), SOUBIGOU (X.) et FAUCONNIER (Y.), *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 990.
- [34] LEGROUX (R.) et MAGROU (J.), *Ces Annales*, 1920, **34**, 417.
- [35] MORGAN (W. T. J.), *Biochem. J.*, 1937, **31**, 2003.
- [36] MORGAN (W. T. J.), *Bull. Méd. Brit.*, 1944, **2**, 287.
- [37] NICOLLE (M.), *Ces Annales*, 1917, **31**, 388.
- [38] RAISTRICK (H.) et TOPLEY (W. W. C.), *Brit. J. exp. Path.*, 1934, **15**, 113.
- [39] SEDAILLAN (P.), MONNET (P.) et BERTOYE (A.), *Rev. Immunol.*, 1944-1945, **9**, 14.
- [39 bis] SERTIC (V.) et BOULGAROV (N. A.), *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 35 ; **123**, 951.
- [40] SCHUTZE (H.), *J. Hyg.*, 1921, **20**, 330.
- [41] SCHOLTENS (R. Th.), *Zentralbl. Bakt. I orig.*, 1937, **139**, 467.
- [42] SMITH (T.) et REAGH (A. L.), *J. Med. Res.*, 1903, **10**, 89.
- [43] SOHIER (R.) et HENRY (R.), *Bull. Méd.*, 24 septembre 1938.
- [44] SORDELLI (A.), *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **107**, 736.
- [45] VIOLLE (H.) et NABONNE (A.), *Les fièvres typhoïdes à Marseille*, Leconte, Edit., 1945.
- [46] WEIL (E.) et FELIX (A.), *Wiener klin. Wochenschr.*, 1917, **30**, 1509.
- [47] WEIL (E.) et FELIX (A.), *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1920, **29**, 24.
- [48] WHITE (P.) BRUCE, *Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser.*, n° 103, 1926.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A *SALMONELLA*

II. — LE SÉRO-DIAGNOSTIC

par M^{me} J. GRABAR et A. BONNEFOI (*).

(Institut Pasteur. Service des vaccins.)

Dans un précédent article [3], nous avons résumé les notions actuellement admises sur la structure antigénique des germes du groupe *Salmonella*. Nous y avons exposé la technique suivie pour l'identification sérologique d'un germe et la détermination de sa composition antigénique. Un protocole simple permet, grâce à l'emploi d'immunsérums spécifiques, d'identifier rapidement un germe isolé d'un produit suspect.

Mais il est parfois difficile d'isoler ce germe, sa recherche ayant été faite trop tardivement, ou n'étant pas toujours possible. Le laboratoire peut encore aider efficacement le clinicien, par l'emploi du séro-diagnostic.

SÉRO-DIAGNOSTIC DE WIDAL.

Depuis qu'en 1896 Widal [23], mettant en présence du sérum d'un malade, un bacille vivant, provoquait l'agglutination de ce dernier, la réaction qui porte son nom a rendu d'inappréciables services. Le test, appliqué d'abord au seul bacille d'Eberth, fut bientôt étendu aux bacilles paratyphiques. On ne tarda pas à constater la présence de coagglutinations. Notre connaissance actuelle d'antigènes de groupe, communs aux différentes *Salmonella*, peut expliquer ces phénomènes ; ils peuvent être évités par la sélection des souches et l'emploi strict de celles ne possédant pas d'antigène commun prédominant.

Depuis, la réaction de Widal, toujours plus largement utilisée, n'a plus cessé d'être critiquée. Certains auteurs constatent des défaillances nombreuses de la réaction. De plus, l'extension des vaccinations antitypho-paratyphoïdiques rend très malaisé le diagnostic de Salmonellose, par cette réaction, chez un sujet antérieurement vacciné. Le séro-qualificatif de Felix résoud cette difficulté. Cette dernière réaction, par l'emploi d'émulsions tuées, standardisées, de manipulation facile, est vraiment la technique de choix.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 janvier 1946.

LE SÉRO-DIAGNOSTIC QUALITATIF DE FELIX.

Nous avons relaté l'extension, aux germes du groupe *Salmonella*, de la découverte faite par Weil et Felix [22], à partir du *Proteus* X 19, d'antigènes différents (antigènes H et O) chez un même germe. Ultérieurement Felix et Pitt décriront l'antigène Vi.

La découverte de ces antigènes allait profondément modifier la technique du séro-diagnostic, et, la faisant bénéficier de ces notions nouvelles, la rendre beaucoup plus précise.

Le lecteur se référera au mémoire précédent [3] dans lequel sont décrits ces différents antigènes.

La méthode qualitative de séro-diagnostic des fièvres typho-paratyphoïdes est basée sur la distinction des agglutinines O et H dans le sérum des malades ; on mettra donc en présence du sérum à identifier des émulsions séparées et spécifiques d'antigènes O et H. La recherche des agglutinines Vi n'est généralement pas faite, la teneur du sérum en anticorps Vi étant très faible.

En vue d'accroître l'exactitude de la méthode et de pouvoir comparer les résultats obtenus par différents expérimentateurs, Kauffmann en 1935 [43], préconisait une standardisation de la méthode. Cet auteur proposait :

L'utilisation par tous des mêmes souches provenant d'un centre unique.

L'entretien des souches sur les mêmes milieux.

La préparation des émulsions selon une formule unique, et la conservation identique de ces émulsions.

Les réactions devant être effectuées par les antigènes O et H séparément.

L'utilisation d'émulsions tuées donnant des agglutinations spécifiques ; ces émulsions sont stables, inoffensives.

Pour l'agglutination H, utiliser une culture en bouillon formolé.

Pour l'agglutination O, utiliser une émulsion alcoolique.

Pour l'agglutination Vi éventuelle, emploi de bacilles « forme V » vivants ou tués au formol.

Tous les laboratoires utiliseront les mêmes dilutions de sérums, les mêmes températures et durées d'incubation, les mêmes méthodes de lecture et d'interprétation des résultats.

L'intérêt de la proposition de Kauffmann apparaît plus clairement encore à la suite d'une enquête internationale sur la réaction de Widal poursuivie en 1935-1936. Felix et Gardner [8] rapportant les résultats de cette enquête, signalent des discordances considérables dans les résultats obtenus par les différents auteurs utilisant cette réaction.

Aussi, dans leur rapport, Felix et Gardner, proposent un certain nombre de recommandations, en vue d'aider les laboratoires à

accroître l'exactitude de la méthode suivie pour pratiquer la réaction de Widal, et de façon à permettre aux différents expérimentateurs d'obtenir des résultats comparables.

Un comité d'experts (1) s'est réuni à Londres en 1937 au Medical Research Council, sous la présidence du professeur Th. Madsen, président du comité d'hygiène de la Société des Nations. Le but de cette conférence était l'étude de la standardisation des méthodes d'agglutination des microbes du groupe *Salmonella*. Ce Comité, après avoir entendu et discuté le rapport de Felix et Gardner, a fait les recommandations suivantes :

1° Pour arriver à la plus grande uniformité possible des résultats de la séro-réaction de Widal, pratiquée dans les différents Instituts, il serait désirable de créer un Centre International qui aurait pour mission de distribuer aux Centres Nationaux approuvés, des sérums « standards » permettant de pratiquer une réaction de Widal « standard » pour les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes A et B. Il serait utile que ce Centre puisse fournir des cultures convenables et des émulsions standards.

2° Le Comité des Experts, se basant sur les propositions faites par le Sous-Comité constitué pour l'étude des *Salmonella* au sein de l'Association internationale des Microbiologistes, exprime le vif désir qu'un Centre international soit créé pour l'identification des souches de *Salmonella*. Il exprime l'avis que l'Institut National Danois des Sérums est spécialement indiqué pour être ce Centre international.

3° Il est recommandé que des Centres Nationaux soient créés dans différents pays et qu'en collaboration avec le Centre international, ils fassent le nécessaire pour assurer dans leur sphère d'action, la standardisation des résultats de la réaction de Widal.

4° Il n'est fait aucune recommandation stricte pour la technique de la réaction de Widal (routine Widal-Réaction) sur les points suivants :

Dimensions et forme des tubes ;

Volume total du mélange agglutinant ;

Méthodes de préparation des émulsions standards ;

Proportions du volume de la dilution du sérum et de l'émulsion standard ;

Emploi de pipettes graduées ou de pipettes compte-gouttes.

Les questions sont laissées au choix des Centres Nationaux ou des Sérologistes qui travaillent isolément. Il est entendu cependant que les résultats obtenus avec les techniques locales seront comparables quantitativement à ceux obtenus par les méthodes du Centre international.

(1) Le Représentant de la France était le Dr Dujarric de la Rivière, Chef de Service de l'Institut Pasteur ; nous lui devons le texte de ces recommandations, et l'en remercions bien vivement.

5° Les experts considèrent comme indispensable l'application des méthodes suivantes :

a) Des émulsions différentes et spécifiques doivent être utilisées pour la recherche des agglutinations H et O.

b) Les suspensions doivent être tuées, conservées, et leur agglutinabilité doit être standardisée.

Les émulsions standards H et O du bacille typhique et d'autres microbes du groupe *Salmonella* préparées et délivrées par le laboratoire des Standards du « Medical Research Council » à Oxford, seront provisoirement acceptées comme des étalons auxquels les suspensions bactériennes, préparées par les différents laboratoires nationaux, devront être comparées.

Le principe de cet étalonnage étant adopté, une émulsion faite par un laboratoire ne devra être considérée comme satisfaisante que si son agglutinabilité ne diffère pas sensiblement de celle de la suspension-standard. On ne devra pas utiliser des émulsions dont le taux d'agglutinabilité serait inférieur de la moitié ou supérieur au double de celui de la suspension-standard. Même dans ces limites, l'agglutinabilité de chaque lot d'émulsions devrait être exprimée en fonction de celle de la suspension-standard, de telle façon que le titre observé pour une suspension quelconque puisse être transformé en « titre standard » (titre que l'on aurait obtenu si l'on avait utilisé la suspension-standard).

Lorsque l'on utilise des suspensions-standards, il est indispensable de suivre scrupuleusement la technique indiquée ci-dessous :

c) La température d'incubation doit être de 50° à 52° dans un bain-marie. Le bain-marie doit être automatiquement réglé de telle façon qu'un tiers seulement de l'émulsion, qui est dans le tube, doit être immergé dans l'eau.

d) Le temps d'incubation avant la dernière lecture doit être de deux heures pour les suspensions H ; de vingt à vingt-quatre heures pour les suspensions O.

e) la lecture finale (c'est-à-dire celle qui est faite à la fin du temps fixé pour l'incubation) doit être la suivante :

L'agglutination H doit être lue dix minutes après la sortie des tubes hors du bain-marie.

L'agglutination O doit être lue au bout d'une heure.

La lecture finale doit être faite à l'œil nu, à la lumière artificielle avec fond noir ou en plaçant un doigt derrière le fond du tube (dans le cas d'agglutination H, l'examen des tubes avant la fin du temps fixé pour l'incubation peut donner des renseignements utiles. Dans le cas de l'agglutination O, il est recommandé d'examiner les tubes au bout de quatre ou cinq heures).

f) Le « titre standard » est la dilution limite de sérum qui, mise en présence d'une suspension-standard, produit le même degré d'agglutination que celui présenté par le « titre d'agglutination standard ».

g) Le nombre de germes de l'émulsion devra se tenir entre 280 et 400 millions par centimètre cube. Une concentration donnée devra être choisie entre ces limites pour toute émulsion : une fois choisie, cette concentration ne devra pas être modifiée.

Suivent des indications pour la sélection des souches, la conservation des cultures, la préparation des émulsions H et O. Nous en reparlerons dans les pages suivantes. Nous allons maintenant décrire nos expériences personnelles, puis nous en discuterons les résultats.

TECHNIQUE DU SÉRO-DIAGNOSTIC.

Utilisant toujours des souches parfaitement lisses, nous avons préparé, au cours de nos recherches, des émulsions selon des principes différents.

- 1° Emulsions de germes vivants, antigéniquement complets.
- 2° Emulsions des mêmes germes, tués par addition de formol.
- 3° Emulsions alcooliques, destinées à révéler l'agglutination O.
- 4° Emulsions formolées, destinées à révéler l'agglutination H. Les techniques suivies sont, elles-mêmes, diverses :

a) Technique par centrifugation.

b) Technique à l'étuve à 37°.

c) Technique au bain-marie à 52°.

Les sérums étudiés proviennent de deux sources différentes :

a) Sérums de lapins immunisés avec des souches sélectionnées.

b) Sérums de vaccinés ou de malades.

A. CHOIX DES SOUCHES. — La technique utilisée est identique pour toutes les *Salmonella*. Prenons comme exemple le bacille typhique.

Plusieurs souches typhiques sont étudiées. Les souches sont repiquées afin d'obtenir des colonies isolées. Ces colonies doivent être rondes, brillantes, transparentes ; elles doivent demeurer lisses ; on le vérifie quarante-huit heures plus tard. La mobilité des germes est vérifiée.

A partir d'une colonie, on recherche, d'une part, l'agglutination vis-à-vis des sérums anti-H, anti-O, anti-Vi ; d'autre part, on ensemence un tube de gélose. L'émulsion, recueillie après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, est diluée dans de l'eau physiologique ; elle ne doit pas présenter le phénomène d'auto-agglutination, ni d'agglutination spontanée vis-à-vis du formol, aux dilutions normalement utilisées.

La teneur de la souche en antigène glucido-lipidique est déterminée. Le taux limite d'agglutinabilité des différentes souches par un sérum anti-Eberth polyvalent est recherché par la technique d'agglutination à l'étuve à 37°. Ce taux doit atteindre le taux standard du sérum, ou en être très voisin ; sont seules retenues les souches satisfaisant à cette épreuve.

Ces souches sont alors mises en présence de sérums antipara-typhiques A, B et C. Il ne doit pas se produire de coagglutination ;

donc peu ou pas de facteur antigénique XII. Les souches remplissant ces différentes conditions sont seules utilisées pour la préparation des émulsions.

B. CONSERVATION DES SOUCHES. — Les souches sont repiquées sur gélose culot à 1,5 p. 100, de pH 7,4, une fois par mois, et conservées à la température du laboratoire, à l'obscurité.

C. PRÉPARATION DES ÉMULSIONS. — 1° *Emulsions préparées à partir de germes vivants.*

On recueille dans de l'eau physiologique la culture de vingt-quatre heures à 37° de la souche sélectionnée ; la teneur en corps microbiens est ramenée autour de 400 millions au centimètre cube.

2° *Emulsions préparées à partir des mêmes germes, tués par le formol.*

L'émulsion obtenue ci-dessus est additionnée de 0,2 p. 100 de formol ; on vérifie l'arrêt de toute croissance, par repiquage.

3° *Emulsions destinées à révéler l'agglutination H.*

Une colonie isolée, sur gélose inclinée, de la souche sélectionnée, est ensemencée dans un ballon de 300 c. c., contenant environ 250 c. c. de bouillon de viande à pH 7,4. Après huit heures [14] de séjour à l'étuve à 37°, on ajoute 0,2 p. 100 de formol du commerce, puis le ballon est remis à l'étuve pendant vingt-quatre heures. On s'assure par des repiquages que toute croissance est arrêtée. La teneur microbienne est de 280 à 400 millions de germes au c. c.. Le formol est utilisé pour sa propriété d'inhiber d'une façon très nette l'agglutination O des bacilles flagellés.

Des émulsions sont ainsi préparées avec les souches : Eberth, antigéniquement complète, Eberth H 901, paratyphiques A, B et C.

4° *Emulsions destinées à révéler l'agglutination O.*

Une culture de vingt-quatre heures, à l'étuve à 37°, sur gélose inclinée, obtenue à partir de la colonie sélectionnée, est émulsionnée dans 2 c. c. d'eau physiologique, additionnée de 2 c. c. d'alcool à 96°. On remet à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures. L'émulsion finale est préparée par dilution, avec de l'eau physiologique, à 8,5 p. 1000 de cette émulsion alcoolique, de telle sorte que la teneur en corps microbiens soit de 400 millions par centimètre cube.

Des émulsions sont préparées avec des souches : Eberth antigéniquement complète, Eberth O 901, paratyphiques A, B et C.

Techniques.

I — TECHNIQUE PAR CENTRIFUGATION. — Nous utilisons la centrifugeuse Jouan, disposant de 4 godets à centrifuger, chacun de 4 tubes.

Nous préparons, en premier lieu, des dilutions croissantes du sérum à identifier (2) selon le protocole suivant : dans un premier tube, on introduit 0,1 c. c. de sérum pur ; il est étendu à 1 c. c. avec de l'eau physiologique ; après avoir bien mélangé cette dilution au 1/10, 0,5 c. c. est porté dans un second tube et complété à 1 c. c. avec de l'eau physiologique ; le sérum est dilué au 1/20. L'opération sera poursuivie s'il y a lieu.

TABLEAU I.

	TUBE 1	TUBE 2	TUBE 3
Sérum	0,1	0,5, tube 1.	0,5, tube 2.
Eau physiologique	0,9	0,5	0,5
Dilution du sérum	1/10	1/20	1/40

On prélève alors 0,1 c. c. du sérum dilué au 1/10 ; on l'introduit dans un tube à centrifuger ; on complète à 1 c. c. par addition de l'émulsion microbienne étalon. La dilution finale du sérum est de 1/100 ; on prépare également une dilution au 1/200. Dans un troisième tube qui servira de témoin, on mélange 0,1 c. c. d'eau physiologique et 0,9 c. c. d'émulsion microbienne. Ce dernier tube ne doit pas présenter d'agglutination après l'opération. Le sérum est mis en présence d'émulsions du bacille d'Eberth, des bacilles paratyphiques A, B et C.

Les tubes sont centrifugés pendant cinq minutes, à la vitesse de 3.000 tours-minute. Le culot de centrifugation est remis en suspension par un choc léger sur la partie inférieure du tube. La lecture se fait à l'œil nu, en plaçant le doigt derrière le tube, ou en portant ce dernier devant l'agglutinoscope.

Les figures ci-dessous montrent l'aspect des différentes agglutinations.

Si une ou plusieurs des émulsions sont agglutinées par le sérum du malade, l'opération se poursuit pour cette ou ces émulsions. On décele très rapidement le taux maximum d'agglutinabilité du sérum.

Lorsque les émulsions utilisées sont des émulsions alcooliques, pour la recherche des anticorps O, et des émulsions formolées pour la recherche des anticorps H, un jeu de 8 émulsions est néces-

(2) Eviter l'emploi de sérums hémolysés.

saire. Avec chacune, on opère pour deux dilutions différentes du sérum au 1/100 et 1/200.

Un godet contient, par exemple :

GODET 1	TUBE 1 1/100	TUBE 2 1/200	TUBE 3 1/100	TUBE 4 1/200
Sérum + émulsion alcoolique ou formolée. .	E _o	E _o	E _H	E _H

Les 3 autres godets : le même jeu de tubes avec les émulsions

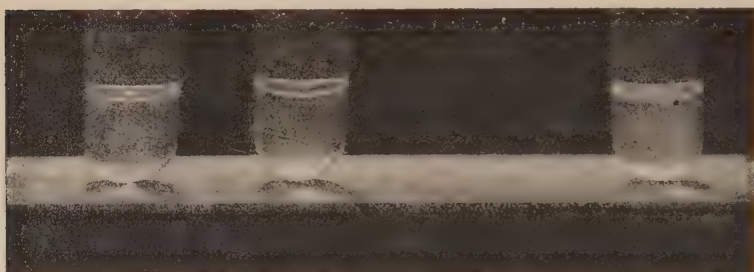


FIG. 1. — Agglutination O : positive dans le premier tube, négative dans le second et le témoin; finement granulaire. Le liquide ambiant est clair, une opalescence partielle du liquide indique la fin de la réaction.



FIG. 2. — Agglutination H : positive dans les deux tubes, négative dans le témoin; gros agglutinats floconneux, se dissociant facilement.

analogues des bacilles paratyphiques A, B et C. Après centrifugation de quelques minutes, on obtient, par exemple le résultat suivant :

ÉMULSIONS	E _O		E _H		A _O	A _H	B _O		B _H		C _O	C _H
	1/100	1/200	1/100	1/200			1/100	1/200	1/100	1/200		
Agglutination.	+	+	+	+	—	—	+	—	+	+	—	—

Le sérum est alors dilué au 1/40, 1/80, 1/60, 1/320 comme indiqué plus haut. Puis on introduit 0,1 c. c. de ces dilutions dans des tubes en complétant avec 0,9 c. c. des émulsions E_O, E_H, B_H, seulement. La négativité de la réaction pour les émulsions de bacilles paratyphiques A et C, la saturation rapide du sérum par l'émulsion B_O, font penser à une infection par bacille d'Eberth. De plus, comme nous le verrons plus loin, le taux de l'agglutination H étant bien plus élevé que celui de O, dans un deuxième tour de centrifugation, on utilise deux godets :

PREMIER GODET	E _H			
	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
Sérum dilué à	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200
Résultat de l'agglutination . . .	+	+	+	—
DEUXIÈME GODET	E _O		B _H	
	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
Sérum dilué à	1/400	1/800	1/400	1/800
Résultat de l'agglutination . . .	+	—	—	—

On est en présence d'une infection à bacille d'Eberth.

Le résultat du séro-diagnostic est le suivant :

	E _H	E _O	B _H	B _O
Agglutination	1/1.600	1/400	1/200	1/100

Si le sérum n'est pas épuisé, par exemple par l'émulsion E_H, (la réaction étant positive à 1/3.200), on effectue une troisième centrifugation pour cette seule émulsion, si l'on désire connaître le taux extrême d'agglutinabilité du sérum du malade.

Nous avons choisi volontairement un exemple où le sérum agglu-

tinait les émulsions de deux germes différents. Nous reviendrons sur ce phénomène un peu plus loin. Généralement, les émulsions d'un seul germe sont agglutinées (voir tableau VI, page 12) ce qui démontre la simplicité et la spécificité de la méthode.

II. TECHNIQUE A L'ÉTUVE A 37°. — Le principe a été décrit dans l'article précédent, mais ici le sérum est inconnu et l'on utilise des émulsions étalons.

Les tubes séjournant deux heures à l'étuve à 37°, puis vingt heures à la température du laboratoire, avant la lecture de la réaction, cette technique offre l'inconvénient d'être lente.

De plus, il est nécessaire de préparer d'emblée un jeu plus important de tubes pour chacune des émulsions, l'opération qui dure déjà vingt-quatre heures, ne pouvant être répétée sans perdre son intérêt pratique.

III. TECHNIQUE AU BAIN-MARIE A 52°. — Le protocole expérimental est le même que pour la technique précédente, mais on opère au bain-marie à 52°, selon les recommandations émises page 4.

Résultats.

Nous avons simplement utilisé la technique au bain-marie à 52°, à titre d'essai.

COMPARAISON ENTRE LES RÉSULTATS OBTENUS PAR CENTRIFUGATION ET A L'ÉTUVE A 37°.

Nous avons examiné, par ces deux techniques, des :

a) SÉRUMS DE LAPINS IMMUNISÉS. — La possession de ces sérums agglutinants nous était indispensable pour l'identification des souches fraîchement isolées.

Nous avons préparé des sérums polyvalents (plusieurs dizaines), renfermant tous les anticorps engendrés par un microbe, injecté vivant à l'animal. Les émulsions utilisées sont des émulsions alcooliques (O) et formolées (H) de bacilles typhiques, paratyphiques A, B et C. Nous ne donnerons pas de tableau récapitulatif, les résultats obtenus par les deux techniques d'agglutination étant comparables.

b) SÉRUMS DE SUJETS VACCINÉS. (3) — Nous avons utilisé deux méthodes pour évaluer dans le sérum des sujets vaccinés, l'intensité

(3) Nous tenons à remercier ici le Docteur Laffaille, chef de Service à l'Institut Pasteur, qui nous a procuré ces sérums.

de la réaction provoquée dans l'organisme par l'injection de vaccins : ce sont les tests d'agglutination et de séro-protection. Nous exposerons, par ailleurs, cette deuxième méthode, à laquelle nous accordons une valeur toute spéciale, pour la détermination du degré d'immunité acquis chez un individu.

Nous présentons dans le tableau V, les résultats du test d'aggluti-

TABLEAU V.

ÉMULSIONS UTILISÉES	SUJETS VACCINÉS						
	Ni...	Ta...	Ba...	Si...	Ro...	No...	Va...
Eberth formolé . . { 1. .	—	1/500	1/500	1/500	1/1.000	1/500	1/1.000
	2. .	—	1/500	1/500	1/1.000	1/500	1/1.000
Eberth alcoolique. { 1. .	—	—	—	—	—	—	—
	2. .	—	—	—	—	—	—
H 901 formolé . . . { 1. .	1/1.000	1/500	1/500	1/1.000	1/1.000	1/500	1/1.000
	2. .	1/800	1/500	1/1.000	1/1.000	1/500	1/1.000
O 901 alcoolique. . { 1. .	—	—	—	—	—	—	1/100
	2. .	—	—	—	—	—	1/100
Para A formolé . . { 1. .	—	—	1/100	—	1/100	1/100	—
	2. .	—	1/100	—	1/100	1/100	—
Para A alcoolique. { 1. .	—	—	—	—	—	—	—
	2. .	1/100	—	—	—	—	—
Para B formolé . . { 1. .	1/1.000	1/500	1/200	1/500	1/1.000	1/1.000	1/500
	2. .	1/800	1/500	1/500	1/1.000	1/1.000	1/500
Para B alcoolique. { 1. .	—	—	—	—	—	—	—
	2. .	—	—	—	—	—	—

1, technique par centrifugation; 2, technique à l'étuve à 37°.

nation par centrifugation et à l'étuve à 37°. Nous avons utilisé comme émulsions, les émulsions formolées et alcooliques de bacilles typhiques et paratyphiques A, B et C, qui permettent la recherche séparée des anticorps H et O.

Les résultats sont totalement comparables.

c) SÉRUMS DE MALADES. — Dans un certain nombre de cas, chaque sérum a été mis en présence de plusieurs émulsions : germes vivants, les mêmes tués par le formol, émulsions alcooliques, for-

TABLEAU VI.

ÉMULSIONS UTILISÉES	MALADES									
	Mr. Be...	M. Be...	Fl...	Leb...	Ler...	Lec...	Ma...	Lef...	La...	
Eberth formolé. . { 1 2	1/400 1/800	1/1 600 —	1/800 1/800	1/1 600 1/800	1/200 —	1/800 1/800	1/3 200 1/3 200	1/50 1/50	— 1/1 600	
Eberth alcoolique. { 1 2	— 1/200	1/800 —	1/800 1/100	1/400 —	1/100 —	1/100 —	1/800 1/200	1/100 1/100	— 1/800	
H 904 formolé . { 1 2	1/800 1/1 600	1/1 600 1/1 600	1/800 1/1 600	1/1 600 1/1 600	1/100 —	1/800 1/400	1/3 200 1/3 200	1/50 1/50	1/1 600 1/1 600	
O 901 alcoolique { 1 2	± 1/400 1/800	± 1/400 1/200	1/800 1/200	1/400 1/100	1/400 —	1/200 —	1/800 1/800	— —	1/800 1/400	
Para A formolé. . { 1 2	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
Para A alcoolique. { 1 2	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
Para B formolé. . { 1 2	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
Para B alcoolique. { 1 2	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	

1, technique par centrifugation; 2, technique à l'étuve à 37°.

1, technique par centrifugation; 2, technique à l'étuve à 37°.

molées. Ces différentes émulsions furent préparées à partir d'une même colonie.

Pour ces sérums ainsi examinés, nous n'avons pas relevé de différences sensibles dans les taux d'agglutination des différentes émulsions par un même sérum. Notre but était de vérifier par l'emploi de souches convenables antigéniquement, que le pourcentage des défaillances du Widal classique signalées par certains auteurs était nettement exagéré. Mais puisque pour d'autres raisons, le séro-qualitatif doit être utilisé, nous n'avons pas poursuivi ces expériences comparatives qui mettaient en jeu trop de matériel.

Nous présentons dans le tableau 6 quelques-uns des résultats obtenus en testant des sérums de malades par les deux techniques de l'étuve à 37° et par centrifugation. Nous avons constaté une grande fidélité et une grande sensibilité pour cette dernière, qui est, actuellement, la seule utilisée par nous, lors d'une demande de séro-diagnostic. Nous poursuivons cependant la comparaison des résultats obtenus par les deux techniques, pour la détermination du taux limite d'agglutinabilité de nos immunsérums.

Nous avons recherché la présence d'agglutinines anti-Eberth, dans nos sérums, à l'aide d'émulsions des souches O 901 et H 901 et de souches typhiques dont la connaissance antigénique nous est parfaitement connue.

Le tableau VII témoigne des résultats variables obtenus pour certains sérums, avec ces différentes émulsions.

TABLEAU VII.

MALADES	ÉMULSIONS				OBSERVATIONS
	EO	EH	O 901	H 901	
Sa.....	1/400	1/400	—	—	Hémoculture +
Lo.....	1/3.200	1/1.600	1/1.600	1/200	
Po.....	1/400	1/200	—	—	Hémoculture + Hémoculture +
No.....	1/100	—	—	—	
Le.....	1/100	1/200	—	—	

Un dernier tableau (tableau VIII), précise toute la valeur du séro-qualitatif, pour l'établissement d'un diagnostic lorsqu'il s'agit d'un sujet antérieurement vacciné qui présente une forte pyrexie.

Discussion.

La réaction de Widal, malgré les multiples services rendus, a une valeur très discutable pour certains ; pour d'autres, au contraire, elle constitue un test précieux. Nous ne referons

TABLEAU VIII.

DATE de la prise de sang	ÉMULSIONS					
	E, O	E, H	A, O	A, H	B, O	B, H
14 juillet.	1/200	1/400	—	1/100	—	1/400
21 juillet.	1/100	1/400	—	1/200	—	1/400
31 juillet.	1/200	1/800	—	1/100	—	1/800

pas ici l'historique de la question [42, 49], puisqu'aussi bien, pour des raisons ne mettant pas en cause la valeur de la réaction de Widal, nous proposons l'emploi du séro-qualitatif. Rappelons simplement le principe de la méthode, en éclairant son mécanisme, grâce aux notions actuellement acquises sur les *Salmonella*.

La réaction de Widal met en présence du sérum du malade une émulsion de germes vivants. Nous savons aujourd'hui que ce germe est riche de plusieurs types d'antigènes, par exemple le bacille d'Eberth peut posséder les antigènes H, O et Vi. Le sérum du malade peut donc renfermer les anticorps correspondants. Il peut exister des formes O et H inagglutinables, formes Vi pures (formes V de Kauffmann), des formes O pures (O 901 de Felix) ; des formes lisses, mobiles, renfermant du Vi, O-agglutinables (formes V-W de Kauffmann). On peut dire que ces dernières formes sont pratiquement les seules observées. L'emploi de telles souches dans la réaction de Widal met en présence du sérum du malade, des émulsions de germes vivants riches en antigène H ; l'agglutination provoquée sera donc du type H, agglutination floconneuse, masquant les autres phénomènes.

Le malade lui-même, infecté par une souche antigéniquement polyvalente, possède à des taux variables, les divers anticorps. La réaction de Widal devrait être positive.

Comment expliquer certaines défaillances ? Sans parler de techniques individuelles, souvent mauvaises, l'ignorance, jusqu'à une époque récente de la complexité antigénique du germe, explique l'emploi de souches antigéniquement incomplètes, et par suite la constatation de résultats négatifs. Les auteurs utilisent indifféremment une émulsion de bacilles vivants, tués par la chaleur, formolés, etc. La teneur en microbes de l'émulsion n'est pas prise en considération, malgré l'importance bien connue de ce facteur [2]. De plus, alors que Kauffmann attache un gros intérêt au milieu de culture, qui, selon sa composition, permet la conservation ou favorise la dégradation de certains facteurs antigéniques du microbe, la plupart des auteurs ne semblent pas y prêter attention.

Il faut nécessairement repiquer sa souche dans des conditions déterminées, sur un milieu approprié, à une température convenable.

La date de prélèvement du sérum est un facteur important. L'emploi du séro-qualitatif a permis à de nombreux auteurs, d'enregistrer une antériorité d'apparition des anticorps O chez le malade. La réaction classique de Widal ne doit être recherchée qu'à un certain stade de la maladie, généralement à partir du deuxième septénaire, puisqu'elle présente les caractères d'une agglutination H, d'apparition généralement tardive. Ces remarques peuvent expliquer certains résultats. Ainsi, si nous sommes d'accord avec Delbove et Brisou [5] pour préconiser l'emploi du séro-qualitatif, nous ne suivons pas ces auteurs dans leurs conclusions sur les défaillances nombreuses du Widal. Ils relatent 14 cas pour lesquels le Widal étant négatif, 12 fois le séro-qualitatif fut positif. Mais, ils ajoutent que 13 fois sur 14, le premier échantillon examiné avait été prélevé en même temps que l'hémoculture (à un stade, par conséquent, où les anticorps H peuvent ne pas être apparus) et qu'ils n'ont souvent fait qu'un seul examen. La lecture du tableau qu'ils présentent permet de voir que, pour un certain nombre de cas, les agglutinines H ne sont pas plus décelées par le Felix que par le Widal. Dans d'autres cas, le taux d'agglutination H ne dépasse pas 1/160. Il faut aussi tenir compte de la sensibilité de la méthode ; les auteurs ne mentionnent pas le principe du « Widal classique ». Leur travail met en lumière, une fois de plus, la valeur du séro-qualitatif, qui a permis de poser un diagnostic plus précocement, mais il n'en faut pas conclure, selon nous, à la défaillance du Widal qui n'aurait pas été forcément négatif si le prélèvement sanguin avait été effectué à un stade plus favorable de la maladie.

Andrieu [2], Sedaïllan [49] signalent également un certain nombre de cas, où, seuls, les anticorps O furent présents et révélés par le séro-qualitatif. Nous reviendrons sur ce fait.

Payet [48] par contre, conclut à une valeur égale du Widal. Nous-mêmes avons longtemps utilisé avec profit le Widal. Nous estimons personnellement, que cette réaction, trop décriée récemment, ne l'a pas toujours été avec tout l'esprit critique nécessaire. Si nous n'avons pas poursuivi plus longtemps la comparaison entre les deux techniques, c'est parce qu'en accord avec la plupart des auteurs : Felix, Kauffmann, Delbove, Andrieu, Sedaïllan, pour n'en citer que quelques-uns, et contre l'opinion de Payet, nous estimons, pour d'autres raisons, le Felix indispensable. En particulier, il permet de poser aisément un diagnostic lors d'une pyrexie chez un vacciné, et là, le Widal s'avère d'une interprétation plus délicate ; il faut répéter les prélèvements. En outre, l'emploi d'émulsions tuées, se conservant bien, permet d'obtenir des résultats comparables, et constitue un avantage par rapport au Widal, où l'on use d'émulsions de germes vivants.

donc modifiables d'un repiquage à l'autre, et qui exigent des soins plus particuliers de manipulation.

Rappelons maintenant les règles formulées par la Commission des Experts :

a) Emploi d'émulsions différentes et spécifiques pour la recherche des agglutinines H et O (à partir de souches standard).

b) Ces émulsions sont tuées, conservées.

c) Température d'incubation 50-52° au bain-marie.

d) Lecture, après un séjour de deux heures à l'étuve à 37°, pour l'agglutination H ; deux heures à 37°, puis vingt-deux heures au laboratoire pour l'agglutination O.

Nous utilisons une technique simple et essentiellement pratique de séro-diagnostic, se maintenant dans le cadre de la réaction standardisée définie par la Commission des Experts en 1937. Nous avons respecté le seul grand principe de cette réaction, à savoir l'emploi d'émulsions séparées et spécifiques O et H à partir de souches soigneusement sélectionnées. Nous semblons nous en être écartés sur certains points, en renonçant, par exemple, à l'usage du bain-marie à 52°. Payet [48] lui avait déjà préféré l'étuve à 37°. Felix [9] est revenu, lui aussi, à l'emploi de l'étuve à 37°.

Nous avons comparé les résultats obtenus par la technique à l'étuve à 37°, et par celle par centrifugation. Cette dernière s'est montrée plus fidèle, plus sensible, et surtout plus rapide. Le gros avantage de la centrifugation est de pouvoir donner un résultat précis en très peu de temps, une demi-heure après la réception du sérum au laboratoire, alors que la technique à l'étuve à 37° demande près de vingt-quatre heures. D'autres auteurs tendent à utiliser également la centrifugation, dont Gaetgens [40] a tiré parti le premier.

Nous utilisons, avons-nous dit, des émulsions séparées et spécifiques pour la recherche des agglutinines O et H, à partir de souches soigneusement choisies. Leur préparation a été décrite page 6 ; elle est identique pour les différentes *Salmonella*.

Nous présentons dans le tableau V les résultats obtenus avec des sérums de sujets vaccinés. Nous avons déjà dit que les deux techniques par centrifugation et à l'étuve à 37° donnaient des chiffres comparables. Nous voulons signaler ici que, chez les vaccinés, les agglutinines engendrées sont surtout du type H ; s'il existe des agglutinines O, c'est à un taux très bas, le 1/100 est rarement dépassé. Ces résultats confirment ceux de nombreux auteurs [voir réf. 49]. Le pouvoir moindre d'agglutinabilité des sérums pour le bacille paratyphique A peut s'expliquer par la moins grande teneur en ce bacille de notre vaccin, et aussi, pensons-nous, par le fait que les souches utilisées étaient

anciennes. Depuis, nous avons introduit des souches fraîches, bien connues antigéniquement.

Le tableau VI où sont exposés quelques-uns de nos résultats, avec des sérums de malades, met en valeur une plus grande sensibilité de la technique par centrifugation. De plus, les émulsions étant obtenues à partir des souches sélectionnées, nous n'avons pas de phénomène de coagglutination. Cependant le cas peut se présenter. Nous avons parfois eu, avec des sérums de malades atteints de fièvre typhoïde, des coagglutinations avec des émulsions de bacilles paratyphiques B. Le phénomène est dû à la présence du facteur XII dans ces émulsions. Renouvelant alors nos émulsions, nous avons éliminé le phénomène. Nous ne saurions trop insister sur la nécessité, partant de souches sélectionnées, de contrôler constamment leur structure antigénique. La possibilité de préparer des quantités importantes d'émulsions spécifiques à partir d'une souche connue, la conservation aisée de ces émulsions constituent un des avantages du séro-qualitatif. Le Widal classique, exigeant des germes vivants, nécessite, pour être précis, un contrôle permanent des souches.

Pour la recherche des agglutinines anti-Eberth, nous avons utilisé des émulsions alcooliques et formolées d'une souche d'Eberth, antigéniquement complète et des souches O 901 et H 901. Dans leurs recommandations, les experts ne préconisent d'ailleurs pas ces deux dernières souches, mais toute souche lisse, mobile de *Salmonella*. Nous avons rassemblé, dans le tableau VII, un certain nombre de cas pour lesquels le seul emploi des souches O 901 et H 901 eut donné un résultat négatif. Ces faits méritent de retenir l'attention, car, en France, les travaux déjà publiés font mention uniquement de ces deux souches.

Ayant eu à examiner quelques sérums de sujets antérieurement vaccinés et suspects de fièvre typhoïde, nous rapportons dans le tableau VIII un de ces cas.

Alors que les émulsions formolées des différents germes sont toutes agglutinées par le sérum du malade, seule l'émulsion alcoolique éberthienne l'est également, ce qui permet de porter le diagnostic de fièvre typhoïde.

Nous montrons ainsi quel bénéfice le laboratoire retire de l'emploi du séro-qualitatif, précieux surtout parce que l'aide apportée à la clinique s'en trouve accrue. Cela doit inciter le clinicien à faire appel toujours plus fréquemment au laboratoire. Avant nous, en France, plusieurs auteurs [2, 17, 19] ont décrit leurs techniques personnelles du séro-qualitatif. Mais aucun ne semble en avoir appliqué correctement le principe. S'ils utilisent, en effet, des émulsions séparées pour le bacille d'Eberth (nous allons voir plus loin qu'elles ne sont pas toujours spécifiques), ils persistent, dans la recherche des agglutinines antipara-

typhiques A, B ou C, à ne mettre en œuvre qu'une seule émulsion pour chaque germe. C'est vouloir diminuer la valeur de la technique et ne pas suivre les recommandations de la Commission de Londres.

Puisque, en effet, le diagnostic de fièvre typhoïde chez un vacciné ne peut être porté qu'à l'aide du séro-qualitatif en usant d'émulsions séparées alcooliques et formolées d'Eberth, comment ne pas concevoir et ne pas étendre aux autres germes tous les avantages de la méthode. Un vacciné peut aussi bien contracter une fièvre paratyphoïde qu'une infection éberthienne. Les techniques décrites ne permettent pas de poser ce diagnostic.

Andrieu et ses collaborateurs [2] utilisent pour la recherche des agglutinines O, dues à l'Eberth, la souche O 901 vivante qui, d'après certains auteurs (Carlinfanti [4], Kauffmann [15], Bonnefoi et Grabar [3], renferme toujours un peu d'antigène H. De plus, c'est courir un risque de contamination inutile, puisque la technique standardisée du Felix prévoit l'emploi d'émulsions tuées. En outre, nous avons montré, au cours de cet article, que l'emploi exclusif de la souche O 901 comme émulsion éberthienne, pouvait engendrer des échecs. Leurs émulsions ne sont pas spécifiques, puisque composées de germes vivants. Notons au passage, leur désaccord complet avec tous les auteurs, puisqu'ils considèrent que l'antigène O ne résiste pas à la chaleur. Ils accordent aussi à l'agglutinine O une grande spécificité. Ceci est en contradiction avec les travaux de Felix [7] qui considère, chez un sujet non vacciné, comme positive, une agglutination H au 1/100. L'anticorps H ne se trouvant pas normalement dans le sérum humain ; pour cet auteur, les anticorps O ne sont spécifiques que de groupe. C'est aussi la conclusion de Sedaïlan et Bertoye [19] qui ont élégamment posé le diagnostic d'infection à bacille de Gärtner, chez des malades dont le sérum possédait uniquement, malgré des prélèvements sanguins répétés, des agglutinines O. Leur connaissance du facteur O (IX) commun à l'Eberth et au Gärtner leur a fait penser, en l'absence d'agglutinines H éberthiennes, à une contamination par le second germe.

Ces derniers auteurs n'utilisent cependant pas, eux aussi, des émulsions séparées pour les paratyphiques. Cela ressort encore de leurs conclusions dans un travail récent [20].

Mérieux [17] agit semblablement ; le tableau récapitulatif des antigènes qu'il utilise le démontre. Pour lui, l'agglutination O n'est pas visible à l'œil nu, ce qui l'oppose aux autres chercheurs.

Toutes ces remarques font ressortir la nécessité d'une technique standardisée et approuver la proposition d'Andrieu, d'une réunion des chercheurs s'intéressant à ce problème.

Il reste un dernier point à préciser. A partir de quelle dilution peut-on considérer la réaction comme positive ?

Gardner [41] a examiné un certain nombre de sérums de sujets normaux. Dans 50 sérums, cet auteur a décelé des agglutinines naturelles (anti-O) pour les différentes *Salmonella* à des taux qui sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

ÉMULSIONS ALCOOLIQUES	AGGLUTINATION ALLANT DE			
	0 à 1/25	1/25 à 1/50	1/50 à 1/100	1/100 à 1/200
Eberth	21	16	2	1
Paratyphique A.	50			
Paratyphique B.	44	5	1	

Il n'a pas enregistré la présence d'agglutinines naturelles anti-H. Nous-mêmes avons retrouvé ce fait dans la recherche systématique des agglutinines naturelles chez le lapin avant toute immunisation.

Felix [6] recommande d'adopter le taux de 1/100 pour le bacille d'Eberth, afin d'éliminer toute erreur.

A l'Institut d'Hygiène et de Bactériologie de Strasbourg, où l'un de nous a, pendant plusieurs années, pratiqué la technique de Widal, les taux d'agglutination rendant obligatoire la déclaration de la maladie étaient les suivants : 1/200 pour l'Eberth, 1/300 pour le paratyphique A, 1/500 pour le paratyphique B.

Lemierre [16] considère comme positive, chez un sujet antérieurement vacciné, une agglutination dont le taux est au-dessus de 1/300 pour l'Eberth, 1/100 pour le paratyphique A, 1/200 pour le paratyphique B. Cet auteur préconise, comme nous l'avons déjà mentionné nous-mêmes, la répétition du séro-diagnostic dans un cas douteux, le taux d'agglutinabilité du sérum pour l'un des germes se détachant nettement des autres, au cours d'examen répétés, si le sujet est infecté.

Sohier et Grégoire [21], chez des sujets non vaccinés, reconnaissent comme positive une agglutination dont le taux est au moins 1/50 pour l'Eberth et le paratyphique A, 1/100 pour le paratyphique B, 1/400 pour le paratyphique C.

Andrieu [2] exige pour le bacille d'Eberth des taux minima d'agglutination de 1/320 pour l'émulsion O, et de 1/160 pour l'émulsion H.

Les auteurs que nous venons de citer ont usé de techniques différentes, les uns du Widal, les autres ont adopté le séro-qualitatif, tout au moins pour la recherche de l'Eberth. Les chiffres cités se rapportent soit à des malades non vaccinés, soit à des sujets antérieurement vaccinés.

Le séro-qualitatif, qui permet de déceler les agglutinines H et O séparément par l'emploi d'émulsions différentes et spécifiques, doit être seul adopté.

En conclusion des résultats que nous avons obtenus, nous proposons, en présence de sérums de malades non vaccinés, de considérer comme positive une réaction dont le taux d'agglutination est au moins de 1/100 pour l'Eberth et le paratyphique A (H et O), 1/200 pour le paratyphique B (H et O), 1/400 pour le paratyphique C (H et O). Chez un sujet antérieurement vacciné, dont le sérum a un pouvoir d'agglutinabilité variable et élevé pour les émulsions H des différents germes, le taux d'agglutinabilité vis-à-vis de l'émulsion O de l'un des germes, s'il est supérieur à 1/100 décidera du diagnostic. La répétition du séro-diagnostic permettra d'enregistrer une ascension du taux d'agglutinabilité du sérum pour les émulsions H et O du germe incriminé.

CONCLUSION.

La technique de séro-diagnostic par centrifugation que nous utilisons est une technique rapide, précise. L'emploi d'émulsions séparées et spécifiques H et O respecte le principe du séro-qualitatif « standardisé » proposé par la Commission de Londres, et permet une lecture aisée des divers phénomènes. La technique à l'étuve à 37° donne des résultats sensiblement comparables, mais, plus longue, elle est d'un intérêt pratique moindre.

La valeur du séro-qualitatif dépend de la qualité antigénique des souches étalons, de l'utilisation d'émulsions séparées et spécifiques dont la teneur microbienne doit être connue. Ces conditions respectées, le séro-qualitatif constitue vraiment une méthode de laboratoire précieuse, apte à seconder efficacement la clinique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRIEU, AVERSENQ et M^{me} ALIE. *Toulouse Médical*, 1942. Voir aussi M^{me} ALIE, *Thèse Méd. Toulouse*, 1941.
- [2] ANDRIEU, AVERSENQ, M^{me} ALIE et R. LEVRAT. *Paris Médical*, 15 novembre 1944, 191.
- [3] BONNEFOI (A.) et M^{me} GRABAR (J.). *Ces Annales*, 1946 (sous presse).
- [4] CARLINFANTI (E.). *Boll. Ist. Sier. Mil.*, 1941, **20**, 367.
- [5] DELBOVE et BRISOU. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 167.
- [6] FELIX (A.). *J. Hyg.*, 1928, **28**, 418.
- [7] FELIX (A.). *The Lancet*, 1930, **1**, 505.
- [8] FELIX (A.) et GARDNER. *Bull. Organ. Hyg. Soc. des Nations*, 1937, **37**, 124.
- [9] FELIX (A.), RAINSFORD (S. G.) et STOKES (J.), *Brit. Med. Journ.*, 1941, 435.
- [10] GAETGENS. *Kolle et Wassermann*, vol. 3, **2**, 1305.

- [11] GARDNER. *J. Hyg.*, 1932, **32**, 516.
- [12] GAUTHIER. *Thèse Méd. Paris*, 1917.
- [13] KAUFFMANN (F.). *Bull. Org. Hyg. Soc. des Nations*, juin 1935, **4**, 489.
- [14] KAUFFMANN (F.). *Die Bakteriologie der Salmonella Gruppe*. Einer Munksgaard, édit., Copenhagen, 1941.
- [15] KAUFFMANN (F.). *Communic. Inst. Séroth. Etat Danois*, 1942, **32**, 523.
- [16] LEMIERRE (A.). *Gaz. Hôp.*, 1938, n° 13.
- [17] MERIEUX. *Ann. Biol. Clin.*, 1943, **1**, 245.
- [18] PAYET. *Thèse Méd. Paris*, 1939.
- [19] SEDAILLAN et BERTOYE. *Rev. Immunol.*, 1943, **8**, 6.
- [20] SEDAILLAN et BERTOYE. *Rev. Immunol.*, 1945, **9**, 14.
- [21] SOHIER et GRÉGOIRE. *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1942, 370.
- [22] WEIL (E.) et FELIX (A.). *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1920, **29**, 24.
- [23] WIDAL (F.). *La Presse Médicale*, août 1896.

PROGRÈS RÉCENTS DANS L'ÉTUDE DES ANTIGÈNES ET DES ANTICORPS TYPHOÏDIQUES

par E. CARLINFANTI.

(*Institut sérothérapique de Milan, S. Belfanti.*)

Durant ces dernières années, l'immunologie a réalisé des progrès remarquables dans le domaine de l'infection typhoïdique. Ce sont surtout les notions sérologiques qui ont été l'objet de l'attention des chercheurs. La question de la structure antigénique du bacille d'Eberth a été abordée du point de vue chimique par Boivin et ses collaborateurs qui ont contribué à déceler la nature des antigènes somatiques. Ces auteurs ont constaté que l'antigène O et l'antigène Vi ne sont que les endotoxines du b. typhique, notamment des substances qui diffèrent entre elles par leur teneur en glucides et en acides gras et par leur comportement vis-à-vis de quelques réactifs.

Malgré ces importants résultats, les principales questions de l'immunité antityphoïdique n'ont pas encore trouvé de solution satisfaisante. Dans ce chapitre de l'immunologie, les opinions sont encore divisées entre les auteurs qui pensent que l'immunité antityphoïdique est liée à une modification des cellules réceptives, situées surtout dans l'intestin, et ceux, plus nombreux, qui l'attribuent aux anticorps. Entre ces deux hypothèses, s'est affirmée une opinion plus compréhensive qui attribue le rôle principal aux processus allergiques (hypersensibilité et hyperréaction selon Zironi). Cette conception plus élastique voit dans la capacité de concentrer rapidement autour des microbes des moyens de défense non spécifiques, aussi bien que dans la formation plus prompte d'anticorps, les facteurs qui rendent le sujet immun plus agressif vis-à-vis des b. typhiques.

Le facteur de défense le plus important est probablement la présence, dans les humeurs, de bactériolysines. La lyse extracellulaire des b. typhiques par les sérums immuns a été observée dans la cavité péritonéale des animaux d'expérience, bien que pour cette espèce microbienne elle s'avère moins intense et moins rapide que dans le cas des vibrions. Les sérums antityphoïdiques possèdent un pouvoir anti-infectieux tout à fait remarquable : la centième partie d'un cm³ d'un sérum immun peut protéger la souris contre l'injection intrapéritonéale de plusieurs doses mortelles de

S. typhi vivante. Mais le déterminisme de cette immunité passive n'est pas clair.

On doit considérer à ce propos que seules quelques souches sont capables de provoquer constamment la mort des souris : leur pouvoir pathogène paraît dû principalement à leur capacité de se multiplier dans la cavité péritonéale. Mais le cours très aigu de la maladie fait penser qu'il s'agit moins d'une infection mortelle analogue à la fièvre typhoïde que d'une intoxication par les toxines typhiques.

Les animaux qui ont reçu du sérum antityphoïdique, ne montrent aucun symptôme morbide dans les vingt-quatre heures qui suivent l'infection. Plus tard seulement et si la dose du sérum ne suffit pas à les sauver, ils tombent malades. Cette allure contraste avec celle de l'infection des animaux vaccinés, qui, tout de suite après l'inoculation de bacilles vivants, souffrent d'une maladie qui guérit très rapidement. Ces observations nous portent à admettre que le pouvoir anti-infectieux des sérums est dû surtout à une action antitoxique. La question ne pourra être résolue que lorsque les études sur les toxines typhoïdiques auront éliminé les nombreuses contradictions qui existent à cet égard dans la littérature.

Nous avons cherché avec nos collaborateurs à donner à l'étude de l'immunité antityphoïdique une orientation quantitative en y introduisant les méthodes statistiques. Ainsi nous avons constaté (avec Frangi) que la distribution des fréquences des animaux vaccinés ayant survécu à l'infection d'épreuve selon les logarithmes des doses employées dans la vaccination, donne lieu à une courbe normale (courbe de Gauss). Cela nous a permis d'introduire les méthodes statistiques dans le titrage des vaccins et de déterminer exactement la valeur des diverses méthodes de préparation.

Plus récemment des recherches poursuivies avec Attili et Cavalli nous ont permis de démontrer que les fréquences des logarithmes des taux d'anticorps chez les hommes vaccinés et chez les malades atteints de fièvre typhoïde sont elles aussi distribuées selon la loi de Gauss. Cela nous permet d'affirmer que dans l'étude collective des phénomènes sérologiques spécifiques, c'est à la moyenne géométrique que l'on doit avoir recours pour exprimer un ensemble de résultats par une valeur moyenne qui soit aussi la valeur la plus fréquente, et pour le comparer avec un groupe de résultats analogues.

L'étude sérologique des vaccinés et des malades nous a conduit aussi à rechercher si l'aptitude à se laisser immuniser est un phénomène spécifique ou bien si les individus bien immunisables par un antigène le sont aussi par un antigène de nature différente. En effet, on peut aisément démontrer par les méthodes statistiques

que, en général, les individus qui réagissent par la formation d'une forte concentration d'anticorps vis-à-vis de l'antigène O, réagissent intensivement non seulement vis-à-vis de l'antigène Vi qui a une nature chimique semblable, mais aussi vis-à-vis de l'antigène ciliaire qui est de nature tout à fait différente.

La disposition individuelle à se laisser immuniser, n'est donc pas spécifique pour un antigène, mais relative à des antigènes divers, même de nature tout à fait différente.

A quoi est due cette disposition ? En quoi consiste-t-elle ? Evidemment les facteurs de l'immunisation sont de nature constitutionnelle, mais ils peuvent aussi être acquis ou perdus au cours de la vie, puisqu'on sait que la capacité de former des anticorps peut varier non seulement chez les différentes espèces animales, mais aussi aux différents âges de la vie, au cours d'une maladie, etc.

Or, ces différences peuvent être dues : 1) au fait que chez les individus qui sont meilleurs producteurs d'anticorps, il y a un métabolisme plus actif des plasmaglobulines et par conséquent une plus rapide substitution des globulines normales par les immunoglobulines formées sous l'influence de l'antigène ; 2) au fait que ces individus sont plus fortement influençables par l'antigène, c'est-à-dire que chez eux les cellules vouées à la formation des globulines sont plus sensibles aux stimulations antigéniques.

L'une et l'autre hypothèse peuvent expliquer les variations individuelles et les variations au cours de la vie du même sujet ; et probablement les deux facteurs contribuent à déterminer cette variabilité, comme ils déterminent soit la rapidité de l'immunisation, soit la durée de l'immunité.

Ces observations nous ont amené à étudier chez les animaux d'expérience la corrélation entre les anticorps et la résistance à l'infection typhoïdique. Si l'on titre les anticorps d'animaux vaccinés, on trouve que la teneur en anticorps typhoïdiques de leur sang est fort variable, aussi qu'elle est sans doute plus grande en moyenne chez les animaux qui résistent à l'injection d'épreuve pratiquée avec des bacilles vivants que chez ceux qui succombent (Carlinfanti et Cavalli).

Les résultats de nos recherches démontrent par la voie statistique que les anticorps jouent un rôle important dans la défense contre la *Salmonella typhi*. Il ne s'agit pas d'affirmer que ce sont les anticorps humoraux qui exercent cette influence, car on ne doit pas oublier qu'ils ne sont qu'une conséquence de la présence dans les cellules des anticorps mêmes.

Dans ces recherches on a constaté une corrélation entre anticorps H et immunité, ce qui contraste avec nos connaissances sur le rôle immunitaire des anticorps typhiques. A ce propos, il faut remarquer qu'il s'agit probablement d'une corrélation apparente, due

au fait que chez le cobaye, de même que chez l'homme, il existe une corrélation entre ces deux espèces d'anticorps. Ainsi une corrélation entre anticorps ciliaires et immunité n'est, peut-être, depuis les résultats obtenus jusqu'ici, que la conséquence de la corrélation entre anticorps somatiques et immunité d'une part et de la corrélation entre anticorps ciliaires et somatiques d'autre part.

Un grand progrès a été accompli au cours de ces dernières années par le développement de nos connaissances sur la constitution antigénique du bacille typhique et, en particulier, sur les rapports des antigènes avec la virulence et le pouvoir vaccinant de ce microbe.

Ces notions ont été synthétisées par Boivin dans un rapport au Congrès des Microbiologistes de langue française (1938) où il eut le mérite de mettre en lumière les points obscurs de ce chapitre de l'immunologie. Depuis, le travail des chercheurs, poursuivi même au cours de ces années de guerre, a permis de résoudre quelques-unes des questions que Boivin avait posées aux immunologistes.

RECHERCHES SUR LA RÉSISTANCE A LA CHALEUR DE L'ANTIGÈNE Vi.

Parmi les propriétés de l'antigène Vi, le comportement vis-à-vis de la chaleur joue un rôle de tout premier plan : les bacilles typhiques chauffés à 60-70° pendant une heure ou à 100° pendant dix minutes deviennent inagglutinables par les sérums Vi. Donc l'antigène Vi contenu dans les microbes serait très sensible à la chaleur. Au contraire, le complexe glucido-lipidique Vi extrait des microbes par la méthode de Boivin et Mesrobeanu présente une résistance tout à fait remarquable à l'action de la chaleur : un court chauffage à 100° en milieu neutre ne modifie pas de façon appréciable son pouvoir antigène. En milieu acétique, la chaleur détruit ses propriétés antigènes ; mais alors on constate que l'antigène Vi, à la différence du complexe glucido-lipidique O, met en liberté les acides gras seulement après un autoclavage prolongé à haute pression.

Dans son rapport, Boivin soulignait le comportement différent de l'antigène Vi, selon qu'il est contenu dans les bactéries ou libre dans l'extrait, sans fournir l'explication d'une telle divergence.

Le traitement des suspensions de *S. typhi* vivante par la congélation (—20°, —30°) provoque la lyse de ces bactéries et libère l'antigène Vi complet. Dans les extraits, comme dans ceux obtenus par voie chimique, l'antigène Vi présente une remarquable thermo-résistance en milieu neutre.

Au cours de ces dernières années une série de recherches, poursuivies indépendamment en Angleterre, en Italie, au Japon et en France, apportait une première contribution à la solution de cette question. Quelques chercheurs avaient déjà observé la facilité avec

laquelle l'antigène Vi se dégage du corps bactérien et passe en solution (Schütze, Giovanardi). Ensuite Ogonuchi a démontré que le milieu liquide d'une suspension de bacilles typhiques tués par l'acide phénique ou par le chauffage, contenait des quantités remarquables d'antigène Vi, et Giovanardi et Checcacci ont établi qu'à la suite du traitement par le formol, l'antiformine, l'acétone et le sublimé, cet antigène ne disparaît pas des suspensions vaccinales, mais se libère des microbes et se dissout dans les milieux liquides. Boivin constatait également que l'antigène Vi tend à passer du corps microbien dans le liquide ambiant et Carlinfanti observait que dans les cultures sur milieu solide il se produit une diffusion de l'antigène Vi avec perte de l'agglutinabilité spécifique.

Au cours de ces recherches, nous avons observé le phénomène suivant : si une suspension de bactéries pourvues de l'antigène Vi est chauffée à 100° pendant quelques minutes, elle perd l'agglutinabilité Vi tout en montrant un accroissement très remarquable de son pouvoir antigène Vi, comme il est aisé de le démontrer par la réaction de la fixation de l'alexine.

L'étude des causes de ce curieux phénomène a permis d'établir que l'accroissement de la réactivité de la suspension est dû à une petite partie de l'antigène Vi dissous dans le liquide à la suite du chauffage. Ce qui reste de l'antigène Vi dans le microbe est inactif dans les réactions sérologiques jusqu'à ce qu'un deuxième chauffage le libère du corps bactérien.

Malgré son analogie avec de vieilles expériences de Torikata et avec la thermo-précipitation de A. Ascoli, ce phénomène nous a paru tout à fait intéressant et la méthode employée susceptible d'application à d'autres espèces microbiennes (1).

En vue de préciser la capacité des antigènes microbiens de manifester leur présence dans les réactions sérologiques, nous avons adopté le terme « disponibilité des antigènes microbiens » (pour que l'antigène donne lieu à une réaction sérologique il ne suffit pas qu'il existe dans le microbe, il faut aussi qu'il soit disponible). L'importance de cette précision résulte du fait que les facteurs qui peuvent influencer la disponibilité des antigènes sont nombreux et de nature très variée. L'antigène Vi qui reste dans les microbes chauffés n'est pas disponible, tandis que celui qui est dissous dans le milieu est doué d'une réactivité sérologique très forte (2). L'inagglutinabilité Vi des microbes chauffés est

(1) PETRINI a démontré dans la suite que, comme pour les salmonelles, les brucelles, les colibacilles, le *Proteus*, le bacille de la dysenterie Shiga et les bacilles diphtériques, l'ébullition des suspensions augmente la réactivité en raison du passage des antigènes en solution dans le milieu liquide.

(2) Ces résultats nous ont conduit à introduire en sérodiagnostic la réaction de fixation de l'alexine avec des solutions de l'antigène Vi, afin

due à la diffusion dans le milieu d'une partie de l'antigène Vi et à la non-disponibilité de l'antigène Vi qui persiste dans les corps microbiens après chauffage.

Mais cette explication n'éclaircit pas toute la question.

Les différences entre les propriétés de l'antigène Vi porté par le microbe et l'antigène Vi extrait par la méthode de Boivin-Mesrobeanu, ne concernent pas seulement la réactivité *in vitro*, mais aussi le pouvoir antigène *in vivo*. En effet, le bacille typhique soumis à l'action de la chaleur (70°-100°), devient non seulement Vi-inagglutinable, mais encore il perd toute capacité d'engendrer des anticorps. Peut-on expliquer cette perte par la diffusion de l'antigène Vi du corps bactérien ? Evidemment non, car après le chauffage, le milieu liquide est lui aussi tout à fait dépourvu de pouvoir immunisant.

Les recherches poursuivies *in vivo* ont démontré que l'antigène, qui passe rapidement en solution à la suite du chauffage, n'est pas un antigène complet, mais seulement une fraction hapténique de l'antigène Vi. En soumettant les bacilles typhiques Vi à cette violente méthode d'extraction, on obtient des extraits dépourvus de pouvoir immunisant.

En partant de ces observations, nous nous sommes demandé si la cause de la labilité de l'antigène Vi ne réside pas dans l'extrême solubilité dans l'eau de la fraction glucidique de cet antigène.

On peut, en effet, penser que cette fraction, attirée violemment par le solvant, se détache du reste de la molécule (Schlepper) en rompant un lien moins tenace que celui qui lie la « Schlepper » au corps microbien.

Pour vérifier cette hypothèse, il fallait démontrer que, si on réussit à éviter une telle scission, l'antigène Vi peut être chauffé dans le corps microbien sans perdre ses propriétés. Cette expérience a été effectuée par la dessiccation préalable des bacilles

de mettre en évidence chez l'homme les anticorps correspondants. Chez les malades, cette réaction donne des pourcentages de positivité remarquablement supérieurs à ceux qu'on obtient par la réaction d'agglutination, tandis que les résultats non spécifiques n'atteignent pas 1 pour 100 (Petrini, Manzari, Santagelo et Lapponi). Les recherches de Petrini et de Attili ont démontré que pendant la maladie ces anticorps augmentent beaucoup plus lentement que les anticorps O et H et atteignent leur concentration maxima pendant la convalescence ; nous ne connaissons pas les causes de cette réactivité tardive.

Récemment Checcacci et Fusaroli, faisant eux aussi usage de l'antigène Vi préparé par nous, ont révélé chez quelques porteurs de b. typhique la présence d'anticorps Vi qui disparurent quand les bacilles typhiques disparurent des déjections. Ces auteurs pensent que, grâce à cette recherche, qui est facile à effectuer, même chez un grand nombre de sujets, on peut remédier aux défauts de l'agglutination.

typhiques : on sait que si l'on dessèche ces microbes, ils restent vivants pendant très longtemps. Il faut les chauffer à très haute température (une heure à 120°) pour les tuer. Les bacilles typhiques ainsi chauffés à l'état sec gardent leur agglutinabilité Vi et leur pouvoir antigène *in vivo*. Le chauffage à 120° des microbes préalablement desséchés peut être prolongé même après la mort des bacilles sans que les propriétés de l'antigène Vi soient sensiblement affectées.

Nous avons ainsi fourni la preuve directe de la thermostabilité de l'antigène Vi contenu dans les microbes et de plus une explication satisfaisante des résultats divergents sur lesquels Boivin avait attiré l'attention des immunologistes.

RECHERCHES SUR LA VIRULENCE ET SUR LE POUVOIR VACCINANT DU BACILLE TYPHIQUE.

Les variations du bacille typhique constituent un sujet de recherches fort important parce que la virulence et le pouvoir vaccinant de ce microbe diffèrent selon les souches et même selon les variantes de la même souche. Entre pouvoir vaccinant et pouvoir pathogène des souches du bacille typhique pour les animaux de laboratoire il n'existe pas de concordance stricte : les bacilles pathogènes ont un pouvoir vaccinant beaucoup plus fort que celui des bacilles non pathogènes. Ceux qui sont pourvus d'antigène Vi jouissent d'une activité vaccinnante plus intense que les bacilles qui en sont dépourvus. Dans ce domaine aussi on observe toutefois des divergences entre ces faits et ceux qui concernent les antigènes somatiques isolés par voie chimique. En effet, les essais de vaccination effectués avec des extraits glucido-lipidiques ne montrent pas de différences appréciables entre le pouvoir vaccinant des extraits contenant Vi ou O + Vi (Topley et collaborateurs : Henderson, Morgan, Boivin et Mesrobianu). La discordance entre les résultats donnés par la vaccination avec les bactéries totales et ceux qu'on obtient avec les antigènes extraits des mêmes bactéries a été le point de départ de quelques recherches que nous allons relater.

Felix et ses collaborateurs attribuaient à l'antigène Vi une fonction particulière dans le mécanisme de l'infection typhoïdique. D'autres auteurs (Orskow, Kauffmann, Boivin) pensent que la virulence du bacille typhique est liée à la fois aux deux antigènes somatiques (O et Vi).

Cependant, la question de la virulence ne peut être considérée comme résolue. En 1941, après une série de recherches qualitatives sur les antigènes somatiques glucido-lipidiques, portant sur des souches de différente virulence, Boivin affirmait que la présence de ces antigènes est une condition nécessaire, mais non

suffisante pour déterminer la virulence et qu'il n'existe pas de rapport quantitatif entre la teneur en antigènes glucido-lipidiques et la virulence des différentes souches.

Nous nous sommes attaché à cette question en étudiant les variations provoquées chez les *S. typhi* par la culture *in vivo* chez la souris, méthode qui semblait convenir à l'examen des rapports entre virulence et pouvoir antigène de cette bactérie.

Inoculé à la souris par voie péritonéale, le bacille typhique provoque une intoxication aiguë ; si la dose injectée est assez grande, elle peut amener la mort en quelques heures. Au cours de cette maladie aiguë, on observe une bactériémie d'intensité variable, qui atteint quelquefois le chiffre de plusieurs milliers d'unités microbiennes par centimètre cube de sang. L'étude de ces microbes démontre qu'ils sont différents de ceux de la culture injectée, soit par leurs caractères sérologiques et culturaux, soit par leur haut pouvoir pathogène. En raison de ces différences, on doit penser qu'il s'agit de microbes développés *in vivo*, doués de toxicité et probablement aussi d'un pouvoir d'invasion plus marqué que celui des bacilles typhiques cultivés *in vitro*.

Ensemencés sur gélose, ils donnent des colonies qui diffèrent par quelques caractères des colonies de la souche originelle : elles présentent des bords très réguliers et une surface parfaitement lisse et luisante, quasi muqueuse. L'aspect microscopique des microbes à l'état frais, même sur fond noir, dans les frottis colorés et dans les frottis à l'encre de Chine, ne diffère pas de celui des formes communes des *Salmonella*.

Nous avons poursuivi une série de recherches sérologiques à partir des hémocultures. Les méthodes employées ont été la réaction de fixation de l'alexine, la réaction d'agglutination en tubes et la réaction d'agglutination sur lame.

Les résultats sérologiques obtenus avec les hémocultures furent comparés avec les résultats obtenus avec les cultures originelles. En outre on a comparé les antigènes ainsi préparés avec ceux obtenus à partir de cultures développées à 22°, température à laquelle on obtient un développement très faible de l'antigène Vi, comme le montrent les résultats des réactions de la fixation de l'alexine.

En employant la souche Ty 2, très virulente pour la souris, l'hémoculture obtenue après les deuxième et quatrième passages montre la disparition complète ou presque complète de l'agglutinabilité O, qui était déjà faible au départ, et la disparition ou la diminution de l'agglutinabilité H ; mais, en contradiction avec ce que l'on admet généralement, et en accord avec les observations de Felix sur l'agglutinabilité de la souche Ty 2 et de la souche Watson, on obtient aussi une diminution du taux d'agglutinabilité Vi jusqu'à 1.200, en employant soit les sérums

anti-Vi 965, soit les sérums anti-Ty 2. Cette variante, isolée du sang de la souris, est inagglutinable ou peu agglutinable par les sérums O et H et agglutinable par les sérums Vi seulement à fortes concentrations ; elle est indiquée par la lettre P (pathogène). Sur lame également elle est mal agglutinée par les sérums, quelquefois même elle est inagglutinable par les sérums Vi dilués à 1:20.

Avec la culture à 22°, au contraire, on note une augmentation de l'agglutinabilité de la souche par tous les sérums anti-typhoidiques : le taux d'agglutinabilité augmente deux et même quatre fois ; aussi les résultats de l'agglutination sur lame sont-ils nettement plus évidents avec la variante ainsi obtenue. Celle-ci est donc difficile à classer suivant le schéma V-W de Kauffmann.

TABLEAU I. — Variante sérologique P-V-W de *S. typhi*.

VARIANTE	DÉVELOPPEMENT de l'antigène Vi	AGGLUTINABILITÉ sur lame			AGGLUTINABILITÉ dans les tubes			SENSIBILITÉ au pouvoir bactéricide du sang normal
		Vi	O	H	Vi	O	H	
P. . . .	+++	+	—	—	200-800	— (*)	— (*)	+
V. . . .	++	++	—	+	800-6.400	200-800	200-6.400	++ ou bien +++
V-W . .	+	+	+	+				
W . . .	± ou bien —	—	++	++	—	3 200-25.600	12.800-102.400	+++

(*) Ou bien agglutination incomplète jusqu'à 800-1.600.

A l'exception d'une O- et H-inagglutinabilité constante, la souche 965 de Rauss, qui, elle aussi, est très riche en antigène Vi, se comporte de même. Les souches communes donnent des résultats différents. En effet, l'examen de quelques-unes d'entre elles, choisies au hasard dans notre collection, nous a montré que la culture à 22° provoque la diminution ou la disparition totale de l'agglutinabilité Vi, tandis que l'agglutinabilité O et H augmente toujours. Au contraire, les bacilles typhiques isolés du sang de la souris montrent une hypoagglutinabilité O et H sans accroissement de l'agglutinabilité Vi. Avec les souches plus riches en antigène Vi on a même parfois une diminution de l'agglutinabilité Vi d'une dilution au moins, tandis que l'agglutinabilité O et H disparaît presque complètement.

Ces dernières variantes, obtenues en partant de souches com-

munes, sont indiquées par la lettre P, qui exprime leur affinité avec la variante P de la souche Ty 2. Elles diffèrent encore des variantes V par le fait que, lorsqu'elles sont cultivées à 22°, elles deviennent plus fortement agglutinables par les sérums Vi.

La culture à 22° et les passages *in vivo*, même répétés six fois, n'ont pas modifié de façon appréciable l'agglutinabilité O de la souche O 901, qui est dépourvue des antigènes Vi et H.

Il faut noter que, d'ordinaire, les bacilles typhiques isolés du sang de la souris gardent leurs caractères après plusieurs repiquages sur gélose, et qu'ils les perdent graduellement au cours des repiquages successifs. Quelquefois pourtant un seul passage restitue à la souche ses caractères d'origine.

TABLEAU II. — Conditions favorables aux diverses variations sérologiques de souches de différent pouvoir pathogène

POUVOIR pathogène de la souche	W		V-W	V	P
(O 901)	22°	37°	<i>in vivo</i>		
Faible (H 901)	22	37°	<i>in vivo</i>		
Moyen	22°		37°	<i>in vivo</i>	
			22°	37°	<i>in vivo</i>
Fort (Ty 2) . .			22°	37°	<i>in vivo</i>

Le tableau II résume les conditions de culture capables de produire les diverses variantes avec les souches de différent pouvoir pathogène.

En conclusion, on peut affirmer que lorsqu'on injecte à la souris par voie intrapéritonéale une culture de *S. typhi* riche en antigène Vi (variante V de Kauffmann), on isole à partir du sang une variante qui se montre nettement Vi-hypoagglutinable (variante O) tout en étant très riche en antigène Vi.

Ce phénomène n'est pas facile à interpréter. On peut penser que c'est l'antigène Vi lui-même qui empêche l'agglutination Vi du microbe qui le renferme, en lui conférant une grande stabilité. Mais il est difficile d'admettre qu'un antigène doué d'une forte réactivité, comme l'antigène Vi, puisse garder un tel pouvoir stabilisant après qu'il s'est lié avec l'anticorps à la surface de la bactérie. L'antigène Vi, en effet, contrairement à ce que les résultats de l'agglutination portaient à croire, est doué d'un pouvoir précipitant beaucoup plus fort que l'antigène O, comme le met en évidence la réaction de floculation.

Si la disponibilité sérologique de l'antigène Vi se trouvait dans le corps bactérien comme dans les solutions, le contact avec le sérum anti-Vi et le rapide dépôt sur le microbe d'une couche de globulines immunes fortement hydrophobes devraient rendre promptement agglutinables, même par des traces d'électrolyte les suspensions microbiennes les plus stables.

Cela conduit à supposer que l'inhibition paradoxale de l'agglutination Vi puisse être attribuée à la présence d'un facteur non identifiable à l'antigène glucido-lipidique Vi. Nous avons désigné ce facteur par la lettre P, parce que son action inhibitrice sur l'agglutination Vi se manifeste surtout chez la variante P.

Sur la base de ces observations, le problème de la virulence de la *S. typhi* peut être reconsidéré. Le pouvoir pathogène de ce microbe pour les animaux de laboratoire est défini par le nombre des micro-organismes capables de les tuer par voie intrapéritonéale. La dose mortelle est en général très grande : pour les souches communes de bacille typhique, elle est de 25 à 500 millions de bacilles par gramme de poids. Les souches qui tuent l'animal à une dose plus faible sont rares ; la variante P de la souche Ty 2, par exemple, injectée dans la cavité péritonéale, tue presque tous les animaux à la dose d'environ 2,5 millions de bactéries par gramme d'animal.

La survie des animaux infectés par une dose mortelle varie chez les différentes espèces ; elle est plus brève chez la souris, plus longue chez le cobaye et chez le rat, mais elle ne dépasse pas en général seize heures ; pour des doses trois à quatre fois plus grandes que la dose mortelle, elle n'est que de quelques heures, parfois même deux à trois heures seulement. Il s'agit donc d'une maladie très aiguë qui, par rapport aussi aux grandes quantités de microbes injectés, doit être regardée moins comme une infection analogue à la fièvre typhoïde humaine que comme une intoxication par les toxines typhiques. On sait que les animaux peuvent héberger longtemps dans leurs organes *S. typhi* sans manifester de troubles appréciables.

Il serait toutefois erroné de croire que des bactéries pathogènes comme la variété P de la souche Ty 2 causent la mort par intoxication immédiate indépendamment de leur multiplication dans la cavité péritonéale, c'est-à-dire d'identifier leur pouvoir pathogène à la charge de toxines contenues dans la suspension injectée. En effet, tandis que la dose mortelle de *S. typhi* Ty 2 variante P vivante surpasse huit à vingt fois celle des souches communes, la dose mortelle devient au contraire à peu près égale pour les différentes variantes, si les suspensions sont injectées après stérilisation par le formol ou par le chauffage (Carlinfanti et Frangi).

L'examen de l'exsudat péritonéal met en évidence que, tandis que les microbes en phase P s'y multiplient activement, le nombre

de ceux qui sont peu pathogènes diminue bientôt après l'injection et les germes finissent par disparaître de la cavité péritonéale. La variante P de *S. typhi* diffère donc des autres variantes par sa capacité de se multiplier rapidement dans l'organisme.

A cet égard, il est intéressant de constater que la variante P est faiblement sensible au pouvoir bactéricide du sang ou du sérum normal, tandis que les variantes W et V le sont très intensivement. On pense que la sensibilité différente au pouvoir bactéricide est en relation avec le contenu de la bactérie en antigène Vi, mais une telle relation paraît peu vraisemblable si l'on envisage la très grande sensibilité de la souche Vi N.965 de Rauss au pouvoir bactéricide du sang et du sérum. Même de ce point de vue, donc, la variante P se différencie nettement de la variante V de Kauffmann.

En conclusion, tout en admettant que *S. typhi* en phase P libère dans l'organisme animal une grande quantité de substances toxiques, on doit aussi attribuer son pouvoir pathogène pour les animaux à sa capacité de se multiplier dans l'organisme vivant.

RECHERCHES SUR LE POUVOIR VACCINANT DU BACILLE TYPHIQUE.

L'étude des variantes de *S. typhi* est strictement liée à celle des vaccins antityphoïdiques. De nombreuses recherches ont mis en évidence l'importance essentielle de l'antigène Vi pour l'immunisation contre le bacille typhique, et l'on admet que les microbes employés dans la préparation des vaccins doivent renfermer cet antigène, pour qu'ils puissent conférer une immunité solide vis-à-vis des formes virulentes du bacille d'Eberth.

La méthode statistique nous a permis d'obtenir des informations quantitatives qui peuvent servir à résoudre quelques-unes des questions relatives à l'activité vaccinnante des différentes variantes. A cet égard, il existe des différences très grandes liées à l'absence ou à la présence de l'antigène Vi. D'autre part, entre les souches pourvues d'antigène Vi on trouve des différences fort importantes. Les souches en phase P ont un pouvoir immunisant au moins trente fois plus fort que celui des souches en phase V moins virulentes ; c'est-à-dire qu'il faut employer des doses trente fois plus grandes pour obtenir le même effet avec ces souches.

Cette différence ne peut pas être expliquée simplement par les variations du contenu en antigène Vi. Son interprétation doit probablement être cherchée dans les différences *qualitatives* entre la variante V et la variante P, différences dont les recherches sérologiques et les épreuves de virulence font aussi supposer l'existence. Le facteur P explique-t-il lui-même une action antigénique ? Cela n'est pas facile à établir, mais il est certain que sa présence renforce l'activité immunisante des antigènes Vi et O. Du point

de vue pratique, il importe que les vaccins antityphoïdiques soient préparés avec des bacilles en phase P afin qu'ils contiennent tout le complexe des antigènes de cette variante ; d'autre part, l'immunisation des chevaux producteurs de sérums thérapeutiques doit être effectuée au moyen de cultures vivantes de la variante P.

La fréquence de la variante P du bacille typhique dans les hémocultures et la connaissance de ses caractères sérologiques (surtout son hypoagglutinabilité Vi) nous permettent non seulement d'identifier et d'introduire dans les vaccins plusieurs souches en phase P, mais aussi de les remplacer aussi souvent qu'il est nécessaire pour assurer aux vaccins un très grand pouvoir immunisant. Etant donné les résultats expérimentaux obtenus, une plus forte toxicité des vaccins ainsi préparés n'est pas à craindre. En effet, chez l'homme, ils ne provoquent pas de réactions plus intenses que les autres vaccins antityphoïdiques.

*
* *

La question de la stérilisation des vaccins a été récemment l'objet de nombreuses études dont les résultats sont assez équivoques.

C'est ainsi que le savant anglais Schütze a démontré que sur dix méthodes de stérilisation expérimentées, aucune n'a donné de résultats appréciablement supérieurs aux autres.

Les recherches de Carlinfanti et Frangi portant sur plusieurs centaines de rats blancs et effectuées d'après une méthode rigoureusement statistique, ont démontré que la stérilisation des suspensions microbiennes au moyen de formol à la concentration de 4 p. 1.000 suivie d'un séjour à 37° pendant huit jours, et plus encore la stérilisation par l'acétone, donnent des résultats supérieurs à ceux qu'on obtient par d'autres méthodes, choisies parmi les meilleures (stérilisation par AgNO_3 , HgCl_2 , tricrésol, phénol, anisol, chauffage à 56°), car elles permettent d'obtenir des vaccins moins toxiques et plus actifs.

Toutefois, les différences observées sont relativement faibles si on les compare à celles qui dépendent du choix des souches, ce qui explique les résultats obtenus par Schütze et d'autres auteurs. Dans notre Institut, on a adopté la stérilisation par le formol, qui donne toute satisfaction, même pour la préparation d'une très grande quantité de bacilles typhiques (plus d'un million de milliards par jour).

*
* *

Très importante, surtout dans les pays chauds, est l'étude de la conservation des vaccins, qui diminue au fur et à mesure que la température s'élève.

Bien que le pouvoir agglutinogène soit conservé assez longtemps, du point de vue de l'activité immunisante la durée de la validité d'un vaccin antityphoïdique est sans doute très limitée. Les recherches poursuivies sur ce sujet démontrent que, tandis qu'à la température de la glacière les vaccins antityphoïdiques gardent leur efficacité pendant deux années environ, à une température supérieure, leur activité subit une baisse rapide, telle qu'après un an ils ne possèdent qu'un faible pouvoir vaccinant et après deux ans ils en sont tout à fait dépourvus. Comme l'a observé Oelrichs, ce sont les vaccins plus actifs qui perdent le plus rapidement la plus grande partie de leur activité.

Afin d'augmenter la durée de la conservation, on a proposé l'usage de suspensions concentrées, qu'on dilue au moment de l'emploi, ou de vaccins desséchés. Mais ces méthodes ne sont pas entrées dans la pratique, à cause des difficultés rencontrées, soit dans la préparation des vaccins desséchés sur une grande échelle, soit dans la dilution des vaccins au moment de l'emploi.

Le vaccin préparé d'après la méthode de Löffler, qui consiste notamment dans la stérilisation à 110-120° de microbes desséchés dans le vide, a été expérimenté très largement en Italie par Moreschi, Quarelli, Cesa-Bianchi par la voie intraveineuse. Malgré la facilité de sa préparation et la simplicité de son emploi, ce vaccin a été presque abandonné. Pourtant la méthode présente un grand intérêt pratique, étant donné la résistance de l'antigène Vi dans les conditions où est préparé le vaccin de Löffler.

Nous avons essayé chez le cobaye un vaccin préparé avec des bacilles typhiques en phase P et stérilisé par la méthode de Löffler. Le pouvoir vaccinant de ce vaccin s'est avéré très élevé, au moins égal à celui des vaccins préparés avec les mêmes bactéries stérilisées par le formol (V. tableau III), ce qui apporte la preuve que les propriétés immunisantes de la variante P persistent après la stérilisation des bacilles secs à 120°.

Dans la catégorie des vaccins desséchés et de conservabilité prolongée on doit ranger les vaccins administrés *per os*, qui ont atteint aujourd'hui une très grande diffusion. Leur efficacité, qui résulte de vastes recherches statistiques (Tron, Nokaidse, etc.) et d'expériences sur des animaux de laboratoire, serait certainement accrue s'ils contenaient la totalité du complexe des antigènes de la variante P.

Plusieurs chercheurs ont démontré que les vaccins lysés provoquent par la voie buccale une immunisation bien plus intense que celle déterminée par les vaccins formolés, administrés par la même voie (Zironi, Cathoire, Jantria, etc.). Même *in vitro* les bacilles formolés opposent une résistance remarquable à l'action des ferments digestifs et ne libèrent que des quantités très faibles d'antigènes O et Vi.

TABLEAU III. — Résultats de l'injection intrapéritonéale de 4 d. m. m. de b. typhiques vivants (souche Ty. 2 var. P) aux cobayes vaccinés 20 jours auparavant par voie sous-cutanée avec 2.3 millions de bacilles tués, par gramme.

COBAYES VACCINÉS AVEC :	NOMBRE	COBAYES AYANT SURVÉCUS à 4 d. m. m.	
		après 24 heures	après 48 heures
<i>Un mois après la préparation des vaccins (conservés à 24° C.).</i>			
Vaccin formolé	34	26 (76 p. 100)	24 (71 p. 100)
Vaccin desséché	37	28 (76 p. 100)	28 (76 p. 100)
<i>Dix mois après la préparation des vaccins (conservés à 24° C.)</i>			
Vaccin formolé	50	47 (34 p. 100)	47 (34 p. 100)
Vaccin desséché	50	29 (58 p. 100)	28 (56 p. 100)

Les vaccins *per os* lysés et desséchés doivent donc être préférés à ceux constitués par des bacilles formolés, si l'on adopte une méthode de lyse capable de conserver le pouvoir vaccinant de la variante P.

A la question de savoir s'il convient de protéger les antigènes contre l'action des sucs digestifs, on peut répondre négativement, car si l'on soumet les bacilles typhiques à la digestion par la pepsine en milieu acide par HCl à 37°, pendant quinze à vingt jours, ou par la trypsine ou par les deux diastases successivement, en milieu respectivement acide et alcalin, on obtient des liquides qui immunisent les cobayes à peu près à la même dose que les bacilles non digérés (Zironi, Jantria). On a même constaté que la pepsine, la trypsine et l'érepsine, tout en détruisant l'antigène H, n'ont aucun effet sur les antigènes O et Vi. La dissolution des tablettes vaccinales dans la bouche assure l'absorption des antigènes somatiques tout le long de l'appareil digestif, sans porter préjudice à leur intégrité.

RÉSUMÉ.

L'auteur relate brièvement les recherches poursuivies d'après les méthodes statistiques sur l'immunisation individuelle de l'homme et des animaux avec les antigènes typhiques.

L'étude du problème de la résistance à la chaleur de l'antigène Vi et de la question des rapports entre virulence et pouvoir antigène conduit aux conclusions suivantes :

1° La destruction de l'antigène Vi de *S. typhi* par la chaleur est due à la solubilité dans l'eau d'une de ses fractions ayant caractère de haptène, fraction qui se détache facilement du reste de la molécule. En effet, les bacilles typhiques desséchés peuvent être chauffés à 120° jusqu'à la stérilisation sans que les propriétés de l'antigène Vi soient affectées. On obtient ainsi la démonstration directe de la thermostabilité de l'antigène Vi.

2° En inoculant par voie intrapéritonéale à la souris une culture de *S. typhi* riche en antigène Vi (variante V de Kauffmann), on isole du sang une variante Vi-hypoagglutinable (variante P). Cette inhibition paradoxale de l'agglutination Vi doit être attribuée à un facteur qui accompagne l'antigène Vi et en diminue la disponibilité ; les bacilles en phase P sont peu sensibles aux pouvoirs de défense de l'organisme.

3° Les bacilles typhiques en phase P possèdent un pouvoir vaccinant plus grand que les bacilles en phase V moins virulents.

L'auteur résume les résultats expérimentaux sur lesquels on doit baser les méthodes de préparation et de contrôle des vaccins antityphiques par voie orale et parentérale, en particulier la préparation des vaccins desséchés qui présentent l'avantage de conserver plus longtemps leur activité.

BIBLIOGRAPHIE

- ATTILI (L.). *Boll. Istit. Sieroter. Milan*, 1943, **22**, 272.
ATTILI (L.). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, Séance du 26 juillet 1944.
BOIVIN (A.). *Ces Annales*, 1938, **61**, 426.
BOIVIN (A.). *Rev. Immunol.* 1943, **50**, 516.
CARLINFANTI (E.). *Sierologia e Sierodiagnostics*. Ed. I. S. M., Milan, 1941.
CARLINFANTI (E.). *Boll. Istit. Sieroter. Milan*, 1941, **20**, 207.
CARLINFANTI (E.). *Ztschr. Immunitätsf.*, 1942, **101**, 339.
CARLINFANTI (E.). *Riv. Ital. Igiene*, 1942, **2**, 81.
CARLINFANTI (E.). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, Séances de juin et novembre 1944.
CARLINFANTI (E.). *Giorn. Batt. e Immun.*, 1944, **22**, 173.
CARLINFANTI (E.) et ATTILI (L.). *Giorn. Batt. e Immun.*, 1945, **23**.
CARLINFANTI (E.) et FRANGI (P.). *Boll. Istit. Sieroter. Milan*, 1942, **21**, 145.
CHECCACCI (L.). *Ann. Igiene*, 1941, **51**, 505.
CHECCACCI (L.). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1940, **15**, 650-652.
FÉLIX (A.). *J. Hyg.* 1938, **38**, 751.
GIOVANARDI (A.). *Boll. Soc. Intern. Microb.*, 1937, **9**, 130.
GIOVANARDI (A.) et CHECCACCI (L.). *Atti Accad. Fisiocrit.*, 1940, **8**, 53.
KAUFFMANN (F.). *Bakteriologie der Salmonella-Gruppe*. Einar Munksgaard, Copenhagen, 1941.
MAZZETTI (G.). *Compendio di immunologia e sierologica*, Ed. Vallecchi, Florence, 1943.
OELRICHS (L.). *Ztschr. Immunitätsf.*, 1941, **100**, 119.

- OGONUCHI (H.). *Kitasato Arch. exp. Med.*, 1938, **15**, 1.
PETRINI (M.). *Ztschr. Immunitätsf.*, 1942, **102** 54.
PETRINI (M.). *Boll. Istit. Sieroter. Milan.*, 1942, **21**, 122.
RAINSFORD (S. G.). *J. Hyg.*, 1942, **42**, 297.
SANTAMBROGIO (P.) et LAPPONI (G.). *Policli., sez. med.*, 1944, **51**, 1.
SCHUTZE (H.). *J. Hyg.*, 1936, **36**, 559.
ZIRONI (A.). *Assoc. intern. de Pédiatrie*, IV^e Conférence, Rome, 1937.
ZIRONI (A.). *Fattori di guarigione spontanea delle malattie infettive*. 281.
Ed. I. S. M., Milan, 1927.

RECHERCHES SUR DEUX POLYOSIDES DE SPÉCIFICITÉ DIFFÉRENTE EXISTANT DANS LES FILTRATS DE CULTURE DES BACILLES TUBERCULEUX

par W. SCHAEFER (*)

(Institut Pasteur.
Laboratoires de recherches sur la Tuberculose.)

Dans nos recherches sur la nature des anticorps contenus dans les immunsérums antituberculeux et dans les sérums de malades [15], nous avons montré que ces sérums renferment, en dehors des anticorps lipoidiques, des anticorps réagissant avec un antigène lié à la fraction protéidique des bacilles tuberculeux (1). L'antigène associé aux protéides n'est pas le protéide lui-même ; il a été identifié par K. Meyer à un antigène polyosidique. En effet, K. Meyer [10] a montré qu'il résiste à la digestion par la trypsine et il a pu saturer l'anticorps réagissant avec les protéides par une préparation de polyosides purs, ce qui montrait l'identité de l'antigène fixateur des protéides avec l'haptène polyosidique. Nous avons confirmé ces résultats, toutefois avec cette restriction que la saturation du pouvoir fixateur du complément des protéides, digérés ou non digérés, par les polyosides des bacilles tuberculeux est souvent très incomplète. Il nous semblait donc que certaines différences existent entre les polyosides liés aux protéides et les polyosides libres isolés d'après les méthodes habituelles. C'est ce que nous avons essayé de préciser dans les recherches ci-après.

Nos recherches antérieures ayant été effectuées principalement au moyen de la réaction de fixation du complément alors que la plupart des auteurs (Zinsser [19], Mueller [11], Laidlav et Dudley [8], etc.), dans leurs études sur les polyosides des bacilles tuberculeux, se sont servis des réactions de précipitation, nous

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 11 octobre 1945.

(1) Nous ne parlerons pas dans ce travail des sérums particuliers provenant d'animaux préparés avec des bacilles bovins du type dysgonique lisse dans lesquels nous avons mis en évidence un véritable anticorps protéidique réagissant spécifiquement avec les protéides des bacilles tuberculeux du type bovin.

avons d'abord examiné comparativement comment se comportent ces antigènes dans les deux réactions.

Voici les résultats obtenus avec deux préparations de polyosides isolés des filtrats de culture après élimination de la fraction protéidique de ces filtrats. Nous appellerons les polyosides ainsi obtenus les *polyosides simples* par opposition aux *polyosides complexes* associés à certaines préparations protéidiques des bacilles tuberculeux que nous étudierons plus tard.

ETUDE SÉROLOGIQUE DES POLYOSIDES SIMPLES DES FILTRATS DE CULTURE.

La première préparation de polyosides (polyoside Pz) que nous avons étudiée a été mise à notre disposition par notre collègue J.-J. Pérez (2). Elle a été obtenue de la manière suivante :

Des filtrats de culture de souches humaines âgées de huit à dix semaines, réduits à faible volume par évaporation sous le vide, sont précipités par 2 volumes d'alcool. On élimine le précipité et on met suffisamment d'alcool pour faire 5 volumes d'alcool. Le précipité est recueilli, dissous dans l'eau, évaporé à froid dans le vide, traité par l'alcool et l'éther et desséché dans le vide. Ce précipité est dissous dans l'eau, on ajoute 2 volumes d'acétone, élimine le précipité, puis ajoute suffisamment d'acétone pour faire 2 volumes et demi. Le précipité recueilli est le polyoside actif.

La deuxième préparation (polyoside Ds) a été isolée par nous-même à partir du filtrat d'une souche humaine âgée de treize semaines, comme suit :

Le filtrat lavé et concentré sur un ultrafiltre ne laissant pas passer les protéïdes est déprotéiné par l'acide trichloracétique, dialysé et concentré au bain-marie bouillant sous pression réduite. On précipite ensuite la solution par des concentrations croissantes d'alcool à 95° en présence d'acétate de sodium. La fraction active est soluble à une concentration d'alcool de 66° (2 volumes d'alcool) et précipitable par 3 à 5 volumes d'alcool (75 p. 100 à 85 p. 100 d'alcool). Nous avons utilisé la fraction précipitée par l'alcool à 85 p. 100.

Ces deux préparations ont été examinées en présence de plusieurs sérums antibacillaires de chevaux et de lapins préparés par des injections soit de bacilles bovins dysgoniques lisses cultivés sur le milieu au foie et stérilisés une heure à 70° (cheval 357 et 150, lapin A85 et D151), soit de bacilles vivants de la souche BCG (cheval 64 et 324, lapin A75).

(2) Nous exprimons à notre collègue et ami J.-J. Pérez toute notre reconnaissance pour son obligeance.

Pour les *réactions de précipitation*, on effectue d'abord l'épreuve de l'anneau en introduisant au moyen d'une pipette Pasteur 0,1 c. c. du sérum au fond de petits tubes contenant 0,1 c. c. de dilutions croissantes du polyoside. L'apparition de l'anneau est notée après deux et vingt-quatre heures de séjour au laboratoire. Ensuite on mélange les liquides et on lit les résultats de la précipitation après vingt-quatre heures de séjour à la glacière.

La *réaction de fixation du complément* est effectuée en mélangeant 0,15 c. c. de dilutions croissantes du polyoside avec 0,15 c. c. de l'immunsérum dilué à 1/10 et avec 0,15 c. c. de complément dilué à 1/15. Les tubes sont laissés à la glacière à 4° pendant une heure. Ensuite on ajoute 0,3 c. c. du système hémolytique composé de 2 doses de sérum hémolytique et d'une suspension de globules rouges à 5 p. 100. La lecture est faite après trente minutes de séjour à l'étuve et le lendemain.

Les résultats des titrages de ces deux polyosides sont résumés dans le tableau I qui montre que les deux préparations réagissent

TABLEAU I. — Dose minima active des polyosides simples dans les réactions de précipitation et de fixation du complément.

	CHEVAL 357	CHEVAL 64	CHEVAL 150	LAPIN A 85	LAPIN A 75	LAPIN D 151
<i>Polyoside Pz.</i>						
Précipitation { anneau .	2.000 (1)	1.000	1.000	1 000	750	
{ précipité.	500	30	350	350	100	500
Fixation du complément { à 4° . . .	0	0	500	2.000	250	2.000
{ à 37° . . .	0	0	0	Zone (2)	0	
<i>Polyoside Ds.</i>						
Précipitation { anneau .	2.000	1.000	2.000	1.000	750	
{ précipité.	500	1.000	750	1.000	75	
Fixation du complément { à 4° . . .	0	0	500	6.000	1.000	2.000
{ à 37° . . .	0	0		Zone (2).	0	Zone (2).
(1) 2.000 signifie dilution de 1 : 2.000.000 etc.						
(2) Zone passagère de fixation du complément.						

avec les trois sérums de lapin dans les réactions de précipitation et de fixation du complément, à la condition que cette dernière soit effectuée à basse température (4°). Si l'incubation des tubes est faite à l'étuve, aucune fixation n'a lieu ou elle apparaît seulement dans une toute petite zone autour du point d'équivalence de l'antigène et de l'antisérum. Parmi les réactions de précipitation,

l'épreuve de l'anneau est plus sensible que la réaction par mélange de l'antigène avec l'anticorps. La dose minima active des polyosides varie un peu avec le sérum employé suivant son titre plus ou moins grand en précipitines.

Les sérums de cheval (chevaux n^{os} 357, 64 et 324) se comportent différemment. Ils donnent également les réactions de *précipitation* jusqu'aux mêmes dilutions de polyosides que le sérum de lapin. Par contre, ils sont inactifs dans la réaction de *fixation du complément*, même à 4°. Seul le sérum de cheval n° 150 fait exception. Il donne non seulement les réactions de précipitation, mais encore la réaction de fixation et se comporte ainsi comme le sérum de lapin. L'étude quantitative de la réaction de précipitation a montré qu'il s'agit d'un sérum ayant un titre d'anticorps polyosidiques particulièrement élevé.

Une différence très nette existe donc entre le comportement des polyosides simples vis-à-vis des sérums antibacillaires de lapin et de cheval. Alors que les sérums de lapin donnent à la fois la réaction de précipitation et de fixation du complément, les sérums de cheval donnent la réaction de précipitation, mais ne donnent en général pas la réaction de fixation du complément.

ETUDE SÉROLOGIQUE DES POLYOSIDES COMPLEXES ASSOCIÉS AUX PROTÉIDES DES FILTRATS DE CULTURE.

Contrairement aux polyosides simples dont nous avons vu qu'ils précipitent, mais ne fixent pas le complément avec les sérums antibacillaires de cheval, certaines préparations des protéides (soumis à la digestion trypsique ou non) flocculent et fixent le complément en présence des sérums antibacillaires de cheval.

Le pouvoir fixateur de ces protéides (digérés ou non) persiste encore en présence des sérums antibacillaires de cheval dont on a éliminé tous les anticorps précipitants avec les polyosides simples.

Ceci est également vrai pour les sérums antibacillaires de lapin. Ces sérums flocculent et donnent la réaction de fixation du complément avec les polyosides simples, à condition que la fixation proprement dite soit effectuée à 4°. Ils flocculent et fixent le complément également avec les préparations des protéides digérés. Or, lorsqu'on supprime dans ces sérums les anticorps qui flocculent et fixent le complément en présence des polyosides simples soit en les précipitant du sérum par une quantité appropriée de ce polyoside simple, soit en ajoutant au sérum convenablement dilué un excès de ce polyoside (méthode de l'inhibition spécifique), on constate que ces sérums sont encore capables de donner un précipité et de fixer le complément avec les préparations de certains protéides digérés.

L'expérience reproduite dans le tableau II illustre les faits énoncés. Il montre les réactions de fixation des protéides de 5 souches différentes de bacilles tuberculeux dont une d'origine bovine (B₂) et 4 d'origine humaine (29, Gt, Ost. et 215). Les solutions de ces protéides à 1 p. 1.000 ont été soumises à la digestion par la trypsine et puis examinées en dilutions croissantes en présence d'un sérum antibacillaire de lapin en même temps que la préparation d'un polyoside simple (partie supérieure du tableau). Le polyoside simple réagit avec ce sérum jusqu'à une dilution de 1:2 millions et les solutions digérées des protéides réagissent jusqu'à des dilutions variant, suivant les préparations, de 1:64.000 à 1:256.000.

TABLEAU II. — Réactions de fixation
du complément des protéides digérés (solutions à 1 p. 1.000).

DILUTION des antigènes	B. 2	H. 29	H. Gt.	H. Ost.	H. 215	DU POLYOSIDE Pz Solution à 1 p. 10.000
<i>Sérum lapin A 85 dilué à 1 p. 10.</i>						
1 : 16.	+	+	+	+	+	+
1 : 32.	+	+	+	+	+	+
1 : 64.	+	+	+	+	+	+
1 : 128.	—	+	+	±	+	+
1 : 256.	—	—	+	—	—	+
1 : 512.	—	—	—	—	—	—
<i>Sérum lapin A 85 épuisé avec le Polyoside Pz, dilué à 1 p. 10.</i>						
1 : 2.	+	+	+	—	+	—
1 : 4.	+	—	+	—	+	—
1 : 8.	+	—	+	—	±	—
1 : 16.	—	—	+	—	—	—
1 : 32.	—	—	—	—	—	—
<i>Sérum cheval 357, dilué à 1 p. 10.</i>						
1 : 2.	+	—	+	—	+	—
1 : 4.	+	—	+	—	+	—
1 : 8.	+	—	+	—	+	—
1 : 16.	±	—	+	—	—	—
1 : 32.	—	—	±	—	—	—
1 : 64.	—	—	—	—	—	—

La partie moyenne du tableau montre les réactions des mêmes antigènes en présence du même sérum après épuisement de ses anticorps par un polyoside simple. Le sérum ainsi traité ne réagit plus ni avec le polyoside simple (Pz), ni avec les protéides 29 et Ost, mais il réagit encore jusqu'à des dilutions de 1:8.000 à 1:16.000 avec les 3 autres protéides (Br, Gt et 215). Ces

3 protéides doivent donc contenir, en dehors des polysides simples, présents dans toutes les préparations, un deuxième antigène résistant à la trypsine.

Cette conclusion est confirmée par le comportement des antigènes étudiés en présence d'un sérum antibacillaire de cheval (partie inférieure du tableau). En effet, ce sérum qui ne donne pas la réaction de fixation du complément avec les polysides simples, se comporte comme le sérum de lapin dont on a épuisé les anticorps homologues au polyside simple. Il ne réagit qu'avec les 3 protéides contenant le deuxième antigène trypsino-résistant.

Quelle est la nature de ce deuxième antigène ou haptène?

Afin d'approcher ce problème, nous avons d'abord essayé d'obtenir cet antigène à un état plus pur. A cet effet, nous avons soumis des protéides dont l'examen sérologique avait montré la présence de cet antigène, et des filtrats de culture de bacilles tuberculeux à différentes méthodes de fractionnement. Les méthodes suivantes ont été employées :

1° Séparation des protéides en une première fraction précipitée par l'acide acétique à pH 4,0 et en une deuxième fraction précipitée ensuite par l'acide trichloracétique à 2 ou 8 p. 100.

2° Séparation des protéides en une fraction précipitée par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et en une autre fraction précipitée par le sulfate d'ammonium à saturation.

3° Fractionnement des eaux-mères trichloracétiques des filtrats de culture concentrés au bain-marie sous le vide, après dialyse, par l'alcool à 50 p. 100, 75 p. 100 et 85 p. 100 en présence d'acétate de sodium.

4° Fractionnement de la solution *digérée* par la trypsine des protéides par précipitation à l'alcool à 50 p. 100, 75 p. 100 et 85 p. 100 en présence d'acétate de sodium.

Les protéides étudiés avaient été obtenus par précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation des filtrats (sur filtre Seitz) provenant de cultures sur Sauton âgées de six à huit semaines. Ils avaient été préparés au cours de nos recherches antérieures [15]. Nos filtrats de culture plus récents ont été lavés à l'eau distillée phéniquée et concentrés à un dixième de leur volume original sur des ultrafiltres préparés en entourant des bougies Chamberland L₁ d'une couche de collodion acétique à 8 p. 100 selon la méthode de Fl. Seibert modifiée par K. A. Jensen [5] utilisée pour la préparation de la tuberculine purifiée. La précipitation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation a été effectuée dans une partie de nos expériences en présence d'un tampon de phosphate à pH 7,0 selon les indications de Fl. Seibert [16] qui a montré que, dans ces conditions, les polysides et acides nucléiques ne sont pas entraînés dans le précipité.

La teneur des fractions en *polyosides simples* a été déterminée par la dose minima active qui donne encore la fixation du complément en présence d'un sérum de lapin ; la teneur en *antigène nouveau* (*polyoside complexe*) par la dose minima qui fixe le complément en présence d'un sérum de cheval. Toutes les réactions ont été effectuées à 4°.

Les résultats de ces expériences sont réunis en grande partie dans le tableau III.

Ils permettent de tirer les conclusions suivantes :

1° Le nouvel antigène se trouve surtout dans la fraction des protéides qui est précipitée par l'acide acétique à pH 4,0 et par le sulfate d'ammonium à demi-saturation à pH 7,0. La fraction précipitée ensuite par le sulfate d'ammonium à saturation totale entraîne une quantité importante de polyosides simples. Mais la grande masse des polyosides simples reste dans les eaux-mères déprotéinisées et est précipitée dans celles-ci par l'alcool à 85 p. 100.

2° Les polyosides simples ainsi obtenus réagissent dans la réaction de fixation avec les sérums de lapin jusqu'à des dilutions de 1 à 6 millions. Ils ne réagissent pas avec le sérum de cheval, à l'exception de deux préparations qui réagissent avec ce sérum sous forme d'un faible phénomène de zone. Ces deux préparations (H. 175) renferment donc une certaine quantité du nouvel antigène, fait qui a été confirmé par des expériences dans lesquelles nous avons constaté que ces préparations, ajoutées en excès au sérum de cheval,aturent l'anticorps qui réagit avec le nouvel antigène.

3° Quand on soumet la solution d'un protéide complètement digéré au fractionnement par l'alcool en présence d'acétate de sodium, l'antigène nouveau se concentre dans la fraction qui est soluble dans l'alcool à 50 p. 100 et précipitée par l'alcool à 75 p. 100. La fraction soluble dans l'alcool à 75 p. 100 et précipitée par l'alcool à 85 p. 100 contient exclusivement le polyoside simple. La dose minima active du nouvel antigène précipitant entre 50 et 75 p. 100 est 1:125.000 à 1:250.000, celle du polyoside simple 1:4 millions.

4° Les fractions qui possèdent les propriétés caractéristiques du nouvel antigène (pouvoir fixateur en présence du sérum de cheval et en présence du sérum de lapin épuisé par le polyoside simple) perdent ces propriétés quand on les porte pendant dix minutes à 100° dans une solution de soude n/5. Elles fixent ensuite le complément seulement avec le sérum de lapin (non épuisé par le polyoside) comme si elles contenaient une quantité équivalente du polyoside simple (tableau III, 5° et 6° colonne et tableau IV).

Cette expérience montre que le nouvel antigène possède une

TABLEAU III. — Doses minima actives des diverses fractions.

SOUCH. ET PRODUIT de départ	SÉRUM employé	ACIDR. acétique	ACIDR. trichloracétique	PRÉCIPITR. ACÉTIQUR traité par NaOH	PRÉCIPITR. trichloracétique traité par NaOH	(NH ₄) ₂ SO ₄		ALCOOL à 50 p. 100	ALCOOL à 75 p. 100	ALCOOL à 85 p. 100
						à demi-saturation	à saturation totale			
H 475 Protéides précipités par (NH ₄) ₂ SO ₄ à saturation	Cheval. Lapin.	1 : 64 1 : 128	1 : 16 1 : 64-28	0 1 : 128	0 1 : 64			0 1 : 1		1 : 512 1 : 1 024
H 475 partiellement digéré par la trypsine	Cheval. Lapin.	1 : 128-256 1 : 256		0 1 : 256				0 0		1 : 512 1 : 4 000
H. Ds filtrat de culture.	Cheval. Lapin. Cheval. Lapin.	1 : 4 1 : 64	0 1 : 64			1 : 32 1 : 512	0 1 : 128	0 0		0 1 : 2 000
H. Test. filtrat de culture.	Cheval. Lapin.							0 1 : 1		0 1 : 2 000
H. Test. Protéides précipités par (NH ₄) ₂ SO ₄ à saturation totale . . .	Cheval. Lapin.		1 : 8 1 : 32			1 : 8 1 : 64	1 : 2 1 : 256			
H. M6 filtrat de culture.	Cheval. Lapin.									
H. M6 protéides précipités par (NH ₄) ₂ SO ₄ à demi-saturation.	Cheval. Lapin.	1 : 8 1 : 16	0 1 : 8-16					0 1 : 2		0 1 : 6 000
H M6 protéides précipités par (NH ₄) ₂ SO ₄ à saturation totale . . .	Cheval. Lapin.	1 : 8 1 : 32	0 1 : 128-256							
H G1 protéides précipités par (NH ₄) ₂ SO ₄ à saturation et digérés par la trypsine . . .	Cheval. Lapin.							1 : 32 1 : 32	1 : 128 1 : 128	0 1 : 4 000
B. BCG. filtrat de culture	Cheval. Lapin.	1 : 4 1 : 64	1 : 4 1 : 8	0 1 : 64	0 1 : 4	1 : 32 1 : 64	0 0			0 1 : 64
B Vallée filtrat de culture	Cheval. Lapin.									

Tous les tirages ont été effectués à partir de solutions à 1 p. 1000 de chaque fraction.

TABLEAU IV.

DILUTION des antigènes	POLYOSIDE COMPLEXE à 0,25 p. 1.000		POLYOSIDE SIMPLE à 0 025 p. 1.000	
	Naturel	Chauffé dans NaOH N/5 10 minutes	Naturel	Chauffé dans NaOH N/5 10 minutes
<i>Sérum cheval 324 dilué à 1 : 10.</i>				
1 : 1	+	—	—	—
1 : 4	+	—	—	—
1 : 16.	+	—	—	—
1 : 64.	±	—	—	—
<i>Sérum lapin D 151 dilué à 1 : 10.</i>				
1 : 1	+	+	+	+
1 : 4	+	+	+	+
1 : 16.	+	+	+	+
1 : 64.	±	±	+	+
<i>Sérum lapin D 151 épuisé par le polyoside simple dilué à 1 : 20.</i>				
1 : 1	+	—	—	—
1 : 4	+	—	—	—
1 : 16.	+	—	—	—
1 : 64.	—	—	—	—

composition double. Il est constitué, d'une part, par le polyoside simple et, d'autre part, par une substance ou un groupement qui lui confère une deuxième spécificité et qui, contrairement à celle du polyoside simple, est détruite par l'ébullition dans la soude. Le nouvel antigène est donc un *complexe* du polyoside simple avec une substance ou avec un autre groupement dont la nature reste à déterminer.

5° Les résultats rapportés, obtenus avec la réaction de fixation du complément, ont été confirmés par la réaction de précipitation. Les sérums de cheval et de lapin épuisés par le polyoside simple conservent une partie de leur pouvoir flocculant en présence du polyoside complexe (titre 1:16.000 avec le sérum épuisé au lieu de 1:64.000 avec le sérum non épuisé dans l'épreuve de l'anneau et 1:4.000 au lieu de 1:32.000 dans la réaction par mélange de l'antigène avec l'antisérum). Les sérums épuisés par le polyoside complexe, au contraire, ne réagissent plus ni avec le polyoside complexe, ni avec le polyoside simple.

DISCUSSION.

Les recherches que nous venons d'exposer montrent l'existence, dans les bacilles tuberculeux, de deux polyosides spécifiques diffé-

rents se distinguant par leurs caractères sérologiques et chimiques. L'un de ces polyosides, que nous appelons le *polyoside simple*, donne, avec les sérums antibacillaires de cheval et de lapin, des réactions de précipitation très intenses jusqu'à des dilutions d'antigène supérieures à 1 : 1 million. Ce polyoside dévie également le complément avec les sérums de lapin jusqu'à des dilutions de 1:5 millions, mais il est nécessaire d'effectuer la réaction à basse température (4°). A la température de l'étuve, la fixation n'a pas lieu ou elle ne s'effectue que dans une petite zone autour du point d'équivalence du mélange antigène-anticorps. Les sérums antibacillaires de cheval, malgré leur pouvoir précipitant intense, n'ont pas dévié le complément, sauf dans le cas d'un sérum ayant une teneur en anticorps polyosidiques particulièrement élevée.

La dissociation du pouvoir précipitant et du pouvoir fixateur du complément des sérums de cheval n'est pas un fait particulier au polyoside du bacille tuberculeux. Elle a été découverte par Zinsser et Parker [20] et Avery et Tillett [1] à propos des réactions des polyosides capsulaires spécifiques du pneumocoque I, avec les sérums antipneumococciques spécifiques du cheval. J. Tomcsik [48] l'a signalée pour les réactions des sérums anticharbonneux de cheval avec les extraits polyosidiques de la bactériidie charbonneuse. Pittmann et Goodner [12] l'ont observée dans leurs recherches sur le polyoside du bacille de Pfeiffer et Goodner et Horsfall [3] à propos du polyoside somatique du pneumocoque. Lancefield (d'après Goodner et Horsfall) l'a constatée pour le polyoside somatique du streptocoque hémolytique et nous-même avec G. Sandor [14] en ce qui concerne les réactions du polyoside somatique et de l'haptène polypeptidique capsulaire de la bactériidie charbonneuse avec les sérums anticharbonneux de cheval. Il s'agit donc d'un phénomène concernant tout un groupe de haptènes polyosidiques et même un haptène polypeptidique.

Goodner et Horsfall [3] ont constaté que le polyoside somatique du pneumocoque ne donne même pas de réaction de fixation avec le sérum de lapin avec lequel, pourtant, il floccule et, d'après Lancefield (cité par Goodner et Horsfall), il en est de même pour les réactions du polyoside somatique du streptocoque hémolytique avec les antisérums correspondants de lapin. Nous aurions tiré la même conclusion pour le polyoside du bacille tuberculeux si nous avions effectué la fixation du complément à 37° seulement. A cette température le complément n'est pas fixé ; il faut effectuer la fixation à 4° pour obtenir une réaction positive. Ce dernier phénomène est probablement caractéristique pour les sérums dont le titre en anticorps est faible, comme c'est en général le cas des sérums antituberculeux.

Le *polyoside simple* des bacilles tuberculeux a été isolé des filtrats de culture de bacilles âgés de plusieurs semaines dans la fraction non protéidique restant après élimination des protéides par l'acide trichloracétique. Il est précipité des eaux-mères, débarrassées de l'acide par dialyse, par l'alcool à une concentration entre 75 et 85 p. 100.

Le *polyoside complexe* se trouve à côté du polyoside simple dans les fractions protéidiques obtenues par précipitation des protéides au moyen de l'acide trichloracétique ou du sulfate d'ammonium à saturation totale. On l'enrichit dans la fraction des protéides précipitée par l'acide acétique à pH 4,0 et par le sulfate d'ammonium à demi saturation à pH 7,0. Il est obtenu, à un état encore plus pur, dans la fraction qui, après digestion complète des protéides par la trypsine, est soluble dans l'alcool à 50 p. 100 et précipitée par l'alcool à 75 p. 100.

Ce polyoside complexe donne, comme le polyoside simple, des réactions de précipitation avec les sérums antibacillaires de cheval et de lapin, mais à des taux plus faibles (jusqu'à 1:125 à 250.000 dans la réaction de fixation du complément et jusqu'à 1:4.000 à 1:16.000 dans la réaction de précipitation) et il donne la réaction de déviation du complément non seulement avec le sérum de lapin, mais encore avec le sérum de cheval, et ceci aussi bien quand on effectue la réaction à 37° qu'à 4°.

On pourrait penser que la différence entre le pouvoir réactionnel des deux polyosides est due à des différences exclusivement physiques, comme elles existent entre des corps simples et leurs polymères ou entre des corps chimiques de même structure, mais attachés à des supports inertes de grandeur moléculaire différente. De telles différences de grandeur moléculaire existent très probablement entre les deux polyosides et le fait que l'activité sérologique, par unité de poids, du polyoside complexe n'est que le 1/20 de celle du polyoside simple parle en faveur de telles différences de grandeur moléculaire. Mais il y a, en outre, une véritable différence de spécificité. En effet, un sérum de cheval dont on a épuisé tous les anticorps capables de donner un précipité avec le polyoside simple, continue de fixer le complément en présence du polyoside complexe et de donner avec lui un précipité. De même, un sérum de lapin traité de la même manière perd son pouvoir précipitant et fixateur pour le polyoside simple, mais il réagit encore dans les réactions de précipitation et de fixation avec le polyoside complexe. Par contre, si on épuise ces sérums par le polyoside complexe, ils perdent à la fois leur faculté de réagir avec le polyoside complexe et avec le polyoside simple. Ces expériences indiquent que le polyoside complexe possède deux spécificités : 1° celle du polyoside simple et 2° sa spécificité propre. Cette deuxième spécificité du polyoside complexe est détruite quand on chauffe ce polyoside au bain-marie à 100° pendant dix minutes dans une solution de soude n/5. Après ce traitement, le polyoside complexe se comporte comme le polyoside simple. Il ne donne plus de réaction de fixation avec le sérum de cheval tout en restant précipitable par lui et il donne encore la réaction de fixation et de précipitation avec le sérum de lapin au même taux qu'avant le traitement par la

soude. Enfin il ne réagit plus du tout avec le sérum de lapin dont on a saturé préalablement les anticorps homologues au polyoside simple. Ce polyoside est donc un complexe du polyoside simple avec une autre substance sérologiquement active. Quelle est la nature de cette autre substance ?

Ne disposant pas encore de quantités suffisantes de cet antigène permettant des analyses chimiques, nous ne pouvons, pour le moment, que formuler des hypothèses. Il nous semble probable qu'il s'agit d'un complexe du polyoside et de protéides non atteintes par la digestion trypsique. L'action destructive de la soude à chaud sur la partie non glucidique du complexe trouverait ainsi son explication.

L'existence de complexes protido-glucidiques présentant, dans un champ électrique, une vitesse de migration autonome, a été signalée par Fl. Seibert, Pedersen et Tiselius [47] dans leurs expériences de cataphorèse des protéides tuberculiniques. R. Laporte [6] et R. Laporte et R. Vendrely [7] ont montré que, au cours de l'autolyse des bacilles tuberculeux, des granules cyanophiles sont libérés qui renferment un complexe protido-glucidique (contenant 12 à 15 p. 100 de glucides) caractérisé par sa grande résistance à l'action de la trypsine. Ces granules sont capables de produire des lésions tuberculeuses, de sensibiliser le cobaye à la tuberculine et de déclencher chez l'animal tuberculeux des réactions tuberculiniques. Ils sont précipités des autolysats bacillaires par l'acide acétique à pH 5,8 et même par des sels neutres à faible concentration comme le chlorure de sodium à 2 p. 100.

Le complexe que nous décrivons est constitué par des micelles beaucoup plus petites que ces granules puisqu'il a été isolé des filtrats de culture sur des filtres Seitz qui retiennent ces granules. Sa teneur en protéides est aussi certainement beaucoup plus faible. Au cours de la désintégration autolytique des bacilles tuberculeux qui aboutit à la dissolution des protéides tuberculiniques d'une part et de l'haptène polyosidique simple d'autre part, toute une série de stades intermédiaires peuvent être saisis dans lesquels les polyosides sont encore associés à des quantités plus ou moins grandes de protéides. Notre polyoside complexe correspondrait à un stade assez avancé de cette désintégration.

Nos observations sur la présence d'un complexe polyosidique coexistant avec l'haptène polyosidique simple dans les filtrats des bacilles tuberculeux offrent certaines analogies avec les constatations de Heidelberger et Menzel [4, 9] concernant l'existence de deux polyosides de spécificité distincte dans les extraits de ces bacilles.

L'un de ces polyosides, appelé *polyoside B*, est soluble dans l'alcool méthylique à 75 p. 100 et est précipité par des concentra-

lions d'alcool méthylique de 85 p. 100 et plus. Il précipite avec les sérums antituberculeux de cheval et de lapin à des dilutions jusqu'à 1:2 millions. Il possède un indice optique de dextrorotation faible et un faible degré d'acidité. Il est riche en pentoses et donne à l'hydrolyse du d-arabinose et du mannose.

L'autre *polyoside C* est insoluble dans l'alcool méthylique à 75 p. 100. Il est fortement dextrogyre, a une teneur faible en pentoses et possède un degré d'acidité élevé. Il semble contenir du palmitate de magnésium en combinaison chimique. Traité par l'alcali à froid le palmitate de Mg se sépare et la solution opalescente devient claire. Néanmoins le polyoside conserve sa spécificité particulière. Il précipite avec les sérums antibacillaires jusqu'à des dilutions de 1:2 millions. Chacun de ces deux polyosides possède sa spécificité propre ou, du moins, de petites quantités de chaque fraction ont été obtenues qui présentaient une spécificité nettement distincte. Ainsi le sérum épuisé par le polyoside B est encore capable de former un précipité avec le polyoside C et inversement. Mais la majorité des polyosides isolés par les auteurs renferme les deux spécificités et ils n'ont pas réussi à les dissocier. Ils pensent donc que le bacille tuberculeux contient encore un troisième polyoside qui possède à la fois les deux spécificités.

Si nous comparons les deux polyosides de Heidelberger et Menzel aux nôtres, il semble que le *polyoside B* correspond à notre *polyoside simple*. En effet, tous deux sont solubles dans l'alcool à 75 p. 100 et sont précipités par l'alcool à 85 p. 100. Dans les réactions sérologiques le polyoside B et notre polyoside simple possèdent la même activité intense (au-dessus de 1:1 million). D'autre part, le *polyoside complexe* ressemble au *polyoside C* par sa précipitabilité par l'alcool à 75 p. 100. Mais alors que le polyoside C donne des réactions de floculation jusqu'à des dilutions de 1:2 millions, l'activité de nos préparations du polyoside complexe ne dépasse pas, dans la réaction de fixation, 1:125-250.000 et dans la réaction de précipitation avec les sérums épuisés par le polyoside simple 1:4 à 16.000. En outre, d'après Heidelberger et Menzel, le polyoside C n'absorbe pas les anticorps du polyoside B, tandis que notre polyoside complexe sature les anticorps du polyoside complexe et du polyoside simple. Il se comporte donc, au point de vue sérologique, comme le troisième polyoside de Heidelberger et Menzel qui renferme les deux spécificités.

Mais s'il est probable que notre polyoside complexe est un complexe glucido-protéidique, une telle hypothèse n'a pas été émise pour le polyoside C de Heidelberger et Menzel. En effet, ce polyoside ne renferme que 0,15 p. 100 d'azote et après avoir subi l'action de l'alcali à froid, 0,05 p. 100 d'azote seulement. La question de savoir s'il y a identité ou non entre les observations des auteurs américains et les nôtres doit donc rester encore ouverte.

Peut-être des quantités infimes de protéïdes ou de groupements polypeptidiques sont-elles suffisantes pour conférer au polyoside une nouvelle spécificité.

RÉSUMÉ.

Les filtrats de culture des bacilles tuberculeux renferment deux polyosides de spécificité différente.

L'un, que nous appelons le *polyoside simple*, est soluble dans l'alcool à 75 p. 100 et est précipité par l'alcool à 85 p. 100 et au-dessus. Ce polyoside floccule avec les sérums antibacillaires de cheval et de lapin à des dilutions dépassant 1:million. Il fixe aussi le complément en présence des sérums de lapin jusqu'à des dilutions encore plus élevées à la condition que la réaction de fixation soit effectuée à basse température. Les sérums de cheval, malgré leur pouvoir précipitant, ne donnent pas la réaction de fixation avec ce polyoside à l'exception d'un sérum ayant une teneur en anticorps polyosidiques particulièrement élevée.

L'autre polyoside, que nous appelons le *polyoside complexe*, est précipité avec les protéïdes et, en particulier, avec la fraction qui est précipitée par l'acide acétique à pH 4,0 et par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. On libère ce polyoside des protéïdes par la digestion des protéïdes par la trypsine. Le polyoside complexe est précipité ensuite par l'alcool à 75 p. 100.

Ce polyoside complexe présente non seulement des réactions de précipitation avec les sérums antibacillaires de cheval et de lapin, mais encore il donne avec eux la réaction de fixation du complément, et ceci aussi bien à basse température qu'à l'étuve. Mais le titre de ces réactions est environ 20 fois plus faible que celui du polyoside simple.

Les sérums épuisés par le polyoside simple réagissant encore avec le polyoside complexe, tandis que les sérums qu'on a épuisés par le polyoside complexe ne réagissent plus avec aucun des deux polyosides. Ceci montre que le polyoside complexe renferme deux spécificités : 1° celle du polyoside simple ; 2° sa spécificité propre. Le chauffage du polyoside complexe pendant dix minutes à 100° dans une solution de soude n/5 détruit sa spécificité propre. Il se comporte ensuite comme le polyoside simple.

La signification de ces faits et leurs rapports avec d'autres observations connues est discutée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AVERY (D. T.) et TILLET (W. S.). *J. exp. Med.*, 1929, **49**, 251.
- [2] CHARGAFF (E.) et SCHAEFER (W.). *J. Biol. Chem.*, 1935, **112**, 393.
- [3] GOODNER (K.) et HORSFALL (F. L.). *J. exp. Med.*, 1936, **64**, 201.
- [4] HEIDELBERGER (M.) et MENZEL (A. E. O.). *Proc. Soc. exp. Biol. a.*

- Méd.*, 1932, **29**, 631 et 1935, **32**, 1150 et *J. Biol. Chem.*, 1937, **118**, 79.
- [5] JENSEN (K. A.). BINDSLAV (G.), MÖLLER (S.), HANSEN (A.) et LIND (P.). *Tubercle*, 1938, **49**, 386.
- [6] LAPORTE (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1941, **212**, 138 et 1942, **214**, 887 ; *ces Annales*, 1943, **69**, 262 et 1945, **71**, 51.
- [7] LAPORTE (R.) et VENDRELY (R.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 437.
- [8] LAIDLAV (R. P.) et DUDLEY (H. W.). *Brit. J. exp. Path.*, 1925, **6**, 197.
- [9] MENZEL (A. E. O.) et HEIDELBERGER (M.). *J. Biol. Chem.*, 1939, **127**, 221.
- [10] MEYER (K.). *Ces Annales*, 1937, **59**, 477.
- [11] MUELLER (H.). *J. exp. Med.*, 1926, **43**, 9.
- [12] PITTMAN (M.) et GOODNER (K.). *J. Immunol.*, 1923, **29**, 239.
- [13] SANDOR (G.) et SCHAEFFER (W.). *Ces Annales*, 1935, **55**, 163.
- [14] SCHAEFFER (W.) et SANDOR (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 187.
- [15] SCHAEFFER (W.). *Ces Annales*, 1940, **64**, 301 et 517.
- [16] SEIBERT (Fl. B.). *J. biol. Chem.*, 1940, **133**, 593.
- [17] SEIBERT (Fl. B.). PEDERSEN (K. O.) et TISELIUS (H.). *J. exp. Med.*, 1938, **68**, 413.
- [18] TOMCSIK (J.). *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1930, **119**, 111.
- [19] ZINSSER (H.). *J. exp. Med.*, 1921, **34**, 495.
- [20] ZINSSER (H.) et PARKER (J. I.). *J. Immunol.*, 1923, **8**, 151.

L'AUTOLYSE DU BACILLE DE LA FLÉOLE

par A. ANDREJEW.

(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la Tuberculose.)

Dans l'état actuel de nos connaissances, le phénomène de l'autolyse est étroitement lié à l'activité des systèmes fermentaires.

La célèbre thèse de Pasteur, selon laquelle la respiration inhibe la fermentation, se trouve à la base de nombreux travaux.

Dès 1895-1899, Palladin signale l'activité favorable qu'exerce l'anaérobiose sur l'hydrolyse des albumines par les ferments végétaux. Depuis, de nombreux auteurs ont précisé que les activateurs des ferments protéolytiques sont très souvent des corps réducteurs et que, par contre, les oxydants rendent ces ferments inactifs, vraisemblablement par suite de l'oxydation du groupement $-SH$ qui est indispensable à l'activité enzymatique.

Cette observation a été confirmée sur la glyoxalase (1933), la phosphatase (Roche, 1941), certaines hémolysines (Cohen, Shakman et Perkins, 1937), la cérébrosidase et le lysozime du blanc d'œuf (Hellermann, 1937), et la lipase (Hopkins et Morgan, 1938).

D'autre part, Mirsky et Anson considèrent que le potentiel d'oxydo-réduction joue un rôle important dans l'activité lytique des diastases.

Selon Reiss (1942) le potentiel d'oxydo-réduction détermine le sens de l'activité des enzymes protéolytiques : hydrolyse ou synthèse. Cependant les recherches effectuées sur la pepsine, l'amylose de la salive humaine, ainsi que l'invertine de la levure ont démontré que ces diastases sont également insensibles à l'action d'oxydants et de réducteurs. Et il résulte de nombreux travaux consacrés aux protéinases microbiennes que ces dernières se comporteraient de même (Maschmann, 1938). Par conséquent, il est permis de conclure que les ferments se divisent à ce point de vue en deux groupes : sensibles et insensibles au potentiel d'oxydo-réduction. Les protéinases microbiennes sont aujourd'hui incluses dans ce dernier groupe.

*
* *

Comparant le taux des protéides libérés par le bacille de la fléole dans une culture normalement aérée et dans une culture en atmosphère pauvre en oxygène, on constate une plus grande quantité de protéides dans le premier cas.

Ce fait fut déjà mis en évidence par R. Laporte qui trouva une proportion de protéides plus importante dans des ballons bouchés au coton que dans des ballons capuchonnés au caoutchouc. Laporte admet comme interprétation possible de ce phénomène, que l'évaporation du liquide contenu dans les ballons fermés au coton amène une concentration du milieu qui peut ensuite favoriser la dégénérescence bactérienne et l'extraction des protéides.

Dans nos propres expériences nous avons constaté qu'aucune lyse appréciable des germes ne se produit en anaérobiose stricte. Une culture du bacille de la fléole garde son aspect initial sec et pigmenté même après un an d'anaérobiose à 38°, tandis que la même culture normalement aérée présente une dégénérescence très sensible après un mois et demi d'étuve et prend, après deux mois, l'aspect particulièrement glaireux.

Ce qui nous permet de penser que la présence même de l'oxygène est indispensable à la lyse bacillaire et que l'influence exercée par la concentration du milieu de culture due à l'évaporation du liquide ne représente qu'un facteur secondaire de ce phénomène.

D'autre part, la libération des protéides n'est proportionnelle à la quantité d'oxygène présent que dans une certaine mesure. Nous avons constaté que les quantités d'oxygène exigées par la lyse passent par un minimum et par un maximum et qu'il existe une zone optima ; l'action lytique étant entravée, et pratiquement arrêtée, aussi bien par la présence d'une quantité insuffisante que par un excès d'oxygène.

Par conséquent, si la lyse de ce bacille varie selon les conditions de la respiration, cette variation ne se produit que dans certaines limites. La lyse dépend donc du potentiel d'oxydo-réduction du milieu et exige la présence d'oxygène dans la mesure où ce potentiel se trouve abaissé.

Sans vouloir prétendre, étant donné la complexité du phénomène, que le potentiel d'oxydo-réduction soit le facteur unique de la vitesse et du rendement de la lyse d'une culture du bacille de la fléole, il semble bien cependant qu'il en soit une condition très importante.

D'autre part, en admettant même que la lyse de ce bacille ne soit pas due en premier lieu à l'activité des protéinases, le fait qu'aucune dégénérescence microbienne n'a lieu en anaérobiose stricte, prouverait indirectement que les protéinases sont inactivées quand l'oxygène manque. Par conséquent, il est possible qu'il existe des protéinases microbiennes sensibles aux variations du potentiel d'oxydo-réduction, ce qui infirmerait sur certains points l'opinion relative à l'insensibilité des systèmes protéolytiques bacillaires à l'action des oxydants et des réducteurs.

*
* *

Nous avons constaté, par ailleurs, qu'après une anaérobiose suffisamment prolongée pour stériliser la culture, aucune lyse ne se produit lorsqu'on rétablit le contact avec l'air : les bacilles de la fléole tués par le manque d'oxygène ne se lysent ni pendant ni après l'anaérobiose. Il est donc vraisemblable que si on trouve une quantité de protéides plus importante dans les ballons bouchés au coton que dans les ballons capuchonnés au caoutchouc, c'est parce que la mortalité bacillaire due à la pénurie d'oxygène est plus grande dans le dernier cas, ainsi que nous l'avons montré antérieurement.

L'oxygène serait alors nécessaire non seulement en tant que facteur de l'équilibre du potentiel d'oxydo-réduction du milieu, mais dans un sens plus large, en tant qu'élément indispensable à la vie bacillaire en général et son absence, son insuffisance ou même son excès inhiberaient directement ou indirectement le mécanisme lytique d'une façon définitive. C'est ainsi que, en augmentant sensiblement le potentiel d'oxydo-réduction du milieu par adjonction de quantités croissantes d'eau oxygénée, nous avons pu reproduire le même phénomène de diminution progressive de l'autolyse, que nous avons observé en présence d'une quantité insuffisante d'oxygène.

D'autre part, il a été prouvé que les bacilles acido-résistants tués par la chaleur ou le formol ne s'autolysent pas. Cependant ces agents pourraient non seulement tuer les bacilles mais également détruire ou dénaturer plus ou moins leurs diastases. On ne peut donc pas conclure d'une façon absolue que les bacilles acido-résistants tués ne s'autolysent dans aucun cas. De nos recherches antérieures, il résulte que le jeûne exerce une action léthale relativement rapide sur le bacille de la fléole. En outre, nous avons constaté que ces bacilles s'autolysent au moins aussi vite, sinon plus vite, en milieu de famine qu'en milieu de Long.

Par conséquent, les bacilles tués par la famine s'autolysent et les mêmes bacilles tués par l'anaérobiose ne s'autolysent pas. La façon dont ces bacilles sont tués joue un rôle décisif dans ces deux cas.

D'autre part, même lorsqu'on fait agir sur ces bacilles un même facteur bactéricide avec des intensités différentes, les résultats de l'autolyse sont également différents.

C'est ainsi qu'une culture du bacille de la fléole d'âge déterminé (aux environs du « maximum » de croissance) placée à 20°, 40° et 60° fournit les résultats suivants :

A 20° la mortalité bacillaire relativement faible est suivie d'une autolyse lente ;

A 40° la mortalité sensiblement plus importante est liée à une autolyse beaucoup plus rapide ;

Par contre, à 60° la mortalité est très rapide tandis qu'aucune autolyse n'a lieu.

Ainsi, le même agent (la chaleur) appliqué avec des intensités différentes, tout en exerçant une action létale prononcée n'exclut l'autolyse que lorsque la culture est tuée rapidement.

Puisque l'anaérobiose tue ces bacilles sensiblement plus vite que le jeûne, il est donc possible que la vitesse avec laquelle la culture est tuée conditionne cette différence d'autolyse.

D'autre part, l'anaérobiose en tuant ces bacilles ne peut altérer leurs ferments. En appliquant ce procédé nous obtenons une certaine action sélective que les agents comme la chaleur ou le formol ne fournissent pas. Il en résulte qu'après l'anaérobiose aucune lyse des bacilles morts n'a lieu malgré la présence de leurs ferments inaltérés.

Il est possible que, dans certains cas de la mortalité bacillaire, les ferments soient très peu actifs (par leur qualité ou par leur quantité) ou bien qu'il se trouvent dans des conditions de pH, RH et autres qui entravent leur activité ou encore que l'autolyse de ces germes soit un processus d'ordre physique où les ferments n'interviennent qu'en partie.

PESÉES DES RÉCOLTES TOTALES
EN FONCTION DE LA DURÉE DE LA CULTURE
ET DE SA CONSERVATION A 38°.

On filtre la culture sur un filtre de papier préalablement séché et taré et, après lavage, on place le tout à l'étuve à 60° jusqu'à poids constant.

NUMÉRO	AGE DE LA CULTURE en jours	MILIEU	CENTIMÈTRES CUBES du milieu	RÉCOLTE TOTALE exprimée en gramme de bacilles secs	OBSERVATIONS
1	7	Long.	50	0,71	Récolte maxima.
2	7	Long.	50	0,826	
3	15	Long.	50	0,6195	
4	15	Long.	50	0,578	
5	21	Long.	50	0,4955	
6	21	Long.	50	0,48	
7	30	Long.	50	0,45	
8	45	Long.	50	0,3	
9	60	Long.	50	0,26	
10	75	Long.	50	0,25	La viscosité du milieu rend la filtration extrêmement difficile.
11	90	Long.	50	0,21	
12	105	Long.	50	0,2	

On pèse après refroidissement dans un dessiccateur.

A 38°, on observe dès le huitième jour de culture une diminution très nette de la récolte microbienne totale. Ceci confirme les données sur la mortalité du bacille de la fléole en fonction de l'âge de la culture. La lyse microbienne semble se ralentir sensiblement après deux mois d'étuve et peut être pratiquement considérée comme arrêtée après deux mois et demi.

La culture prend alors un aspect particulièrement visqueux et l'examen microscopique, après coloration au Ziehl, montre à côté d'une masse informe non acido-résistante d'assez nombreux bâtonnets rouges.

DOSAGES DES PROTÉINES EN MILIEU DE FAMINE.

MÉTHODE. — Les bacilles de la fléole sont cultivés sur milieu de Long à 38° pendant sept jours. Le milieu de Long est ensuite aspiré aseptiquement et remplacé par la même quantité d'une solution de famine (composée d'eau physiologique à 9 g. de NaCl par litre, tamponnée par du phosphate de Na et de K, pH=7,3). Les bacilles sont remis à l'étuve. A des intervalles donnés on dose les protéines libérées soit par la méthode de Mestrezat quand il s'agit de faibles quantités de protéines, soit par pesées après précipitation par l'acide trichloracétique. On ramène les résultats au volume du liquide initial.

NUMÉRO DU DOSAGE	DURÉE DU JEUNE en jours	TAUX DES PROTÉIDES en grammes par litre du milieu ramené au volume initial
1	10	0,5
2	17	1
3	22	1,2
4	30	1,5
5	37	1,9
6	48	2,4
7	78	2,5

DOSAGES DES PROTÉIDES DU BACILLE DE LA FLÉOLE CULTIVÉ SUR MILIEU DE LONG.

Le bacille de la fléole ensemencé sur plusieurs ballons contenant 50 c. c. du milieu de Long est cultivé à 38°. A des intervalles donnés on retire un ballon et on dose les protéides libérés dans le milieu par précipitation avec l'acide trichloracétique.

Les dosages des protéides en fonction de l'âge de la culture confirment les résultats précédents. La lyse microbienne com-

NUMÉRO	AGE de la culture en jours	TAUX DES PROTÉINES en grammes par litre du milieu ramené au volume initial	OBSERVATIONS
1 . . .	8	Traces.	pH du milieu au départ : 7,2.
2 . . .	9	0,10	
3 . . .	15	0,40	
4 . . .	21	0, 0	pH du milieu : 5.
5 . . .	31	0,90	
6 . . .	38	1,10	
7 . . .	45	1,30	pH du milieu : 10.
8 . . .	53	2	
9 . . .	60	2,40	
10 . . .	75	2,5	
11 . . .	93	1,6	

mence dès le huitième jour de culture. Le taux des protéides libérés croît rapidement au cours des deux premiers mois et se stabilise entre deux mois et demi et trois mois d'étuve aussi bien en milieu de famine qu'en milieu de Long.

L'intensité du pouvoir tuberculinique exercé par le filtrat d'une culture du bacille de la fléole varie avec l'âge de cette dernière. C'est ainsi qu'un filtrat d'une culture âgée de trois semaines exerce, à volume égal, un pouvoir tuberculinique sensiblement plus faible que celui d'une culture de deux mois.

Cette différence est-elle due à la qualité ou à la quantité seule des protéides libérés au cours de la culture ?

Afin d'élucider cette question nous avons filtré sur bougie Chamberland L2 les cultures d'âges différents et après avoir dosé les protéides de chaque filtrat et les avoir ramenés à la même concentration, nous avons procédé aux épreuves tuberculiniques sur une série de cobayes tuberculeux.

Il ressort de ces essais que les variations du pouvoir tuberculinique au cours de la végétation du bacille de la fléole en milieu de Long sont étroitement liées à l'accroissement du taux des protéides libérés. Il n'y a donc aucune raison d'admettre que la qualité des protéides libérés soit en cause dans ce phénomène.

CONCLUSIONS.

L'autolyse d'une culture du bacille de la fléole ne se produit qu'en présence d'oxygène. Les quantités d'oxygène exigées par la lyse passent par un minimum et un maximum et il existe une zone optima. La lyse se trouve entravée aussi bien en présence d'un excès que d'une quantité insuffisante d'oxygène.

Bien que le potentiel d'oxydo-réduction semble jouer un rôle dans l'autolyse spontanée, l'anaérobiose totale, en inhibant le

processus lytique d'une façon définitive, montre que l'importance de l'oxygène dépasse considérablement le cadre du potentiel d'oxydo-réduction. Les bacilles tués par le manque d'oxygène et remis au contact de l'air ne subissent aucune lyse, bien que leur système fermentaire soit inaltéré. L'oxygène semble donc intervenir surtout indirectement : en tant que facteur indispensable à la vie bacillaire.

Etant donné que les bacilles tués par la famine subissent une lyse et que les mêmes bacilles tués par anaérobiose ne s'autolysent pas, il apparaît que ce n'est pas le fait de leur mort qui supprime l'autolyse, mais la façon dont ils ont été tués. En particulier la vitesse avec laquelle la culture est tuée semble jouer le rôle décisif dans ce phénomène.

Les variations de l'intensité du pouvoir tuberculinique, selon l'âge de la culture paraissent liées non pas à la qualité, mais à la quantité seule des protéides libérés.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREJEW (A). Ces *Annales*. Association des microbiologistes de langue française. Séance du 5 juillet 1945.
BASS et JOHNSON. *Am. Rev. Tub.*, 1929, **20**, 122.
KELLERMANN (L.). *Physiol. Rev.*, 1937, **17**, 454-484.
LAPORTE (R.). Ces *Annales*, 1940, **65**, 282 et 415 ; *Ibid.*, 1941, **66**, 284.
MACHMANN (E.). *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1935, **279**, 225-228 ; 1937, **294**, 1-33 ; 1938, **297**, 284-296.
PALLADIN (V.). *Thèse*, 1895.
REISS (P.). Imprimerie générale. Clermont-Ferrand, 1942.
ROCHE (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 1534-1545.

SUR LA PRÉSENCE GÉNÉRALE DU RUBIDIUM CHEZ LES ANIMAUX

par MM. GABRIEL BERTRAND et DIDIER BERTRAND (1).

En combinant, d'une manière appropriée, les ressources de l'analyse chimique et de la spectrographie, on peut, comme nous y sommes arrivés, reconnaître et même doser des quantités extrêmement petites de rubidium dans des milieux aussi complexes que des cendres d'origine biologique. Cette méthode, appliquée à une série étendue de plantes cryptogames et de plantes phanérogames nous a permis de montrer que le rubidium existe d'une manière constante dans les espèces végétales et qu'il y atteint des proportions relativement élevées, atteignant, en général, plusieurs centigrammes par kilogramme de matière sèche (2).

La présence du rubidium est-elle aussi largement répandue chez les espèces animales et quelle peut être, d'autre part, la proportion du métal alcalin retenue par l'organisme de ces espèces ?

Plusieurs expérimentateurs ont déjà rencontré le rubidium dans le milieu animal. En 1929, Norman Wright, de l'Institut Hannali de Laiterie, en Ecosse, et Jacob Papish de l'University Cornell, ayant utilisé pour la première fois la méthode spectrographique à l'analyse qualitative aussi complète que possible des cendres du lait de vache de 3 localités de Grande-Bretagne et de 6 localités des Etats-Unis, ont compté le rubidium dans la liste des métalloïdes et des métaux qu'ils ont trouvés dans ces cendres. Cependant l'un d'eux (J. P.) a fait observer que dans un des échantillons de lait étudié par lui, la présence du rubidium n'a pu être établie avec certitude (3).

La même année, Hugh Ramage, s'étant servi lui aussi du spectrographe pour analyser des échantillons de sang humain normal et de sang anémique, a noté que « la raie 4202 Å du rubidium était présente dans le spectre du sang normal ; en fait, affirme-t-il, sans donner d'ailleurs aucun détail à ce sujet, le rubidium est présent dans la plupart des parties du corps et il est présent à la fois dans le lait humain et dans le lait de vache » (4).

(1) Un résumé de ce mémoire a été publié dans les *C. R. Acad. Sci.*, séance du 27 décembre 1944.

(2) Ces *Annales*, 1946, **72**, 416-424.

(3) The inorganic constituents of milk, *Science*, 1929, **69**, 78.

(4) Spectrographic chemical analysis, *Nature*, 1929. **123**, 601-602.

En 1930, Munro Fox et Hugh Ramage ont trouvé, toujours au spectrographe, dans le corps d'annélides (analysés entiers) et de mollusques (organes séparés), une série de métaux peu connus : parmi eux, le lithium leur est apparu alors très répandu dans les tissus animaux. Quant au rubidium, ajoutent-ils, « il est moins commun » (5).

En 1931, avec Joseph Harold Sheldon, Hugh Ramage est revenu, mais cette fois d'une manière plus explicite, sur la présence du rubidium dans les tissus humains. Opérant par comparaison avec des poids connus d'un mélange salin artificiel, il a même tenté de déterminer les proportions de rubidium rencontrées. Les chiffres sont généralement compris entre 10 et 40 mg. de métal alcalin par kilogramme de tissu sec, avec quelques exceptions où il y a un peu plus de 40 mg., ou bien, au contraire, il n'y a que des traces ou pas du tout de rubidium. Parmi les tissus dans lesquels le métal n'a pas été constaté, se trouvent le sang (14 fois sur 23) et, dans tous les cas examinés, les dents et les os (6).

Un peu plus récemment encore, en 1935, William Francis Drea a rencontré des traces de rubidium dans le jaune et quatre fois sur cinq seulement dans le blanc d'œuf de poule (7) ; portant ensuite son attention sur le lait, il a déclaré la présence du rubidium contestable dans le lait humain (6 échantillons), mais certaine dans ceux de chèvre (2 échantillons) et de vache (12 échantillons) (8).

Enfin, en 1939, Herbert Dingle et J. H. Sheldon ont émis l'opinion que le rubidium doit être inclus parmi les éléments du lait parce qu'il leur est apparu aussi bien dans chacun des laits de vache, naturels ou manufacturés, dont ils ont passé les cendres au spectrographe que dans un échantillon moyen de lait humain provenant du mélange de 22 nourrices en bonne santé (9).

D'une manière générale, les auteurs ci-dessus ont soumis les cendres totales, sans aucun traitement, à l'action d'un chalumeau à oxygène ou d'un arc électrique à électrodes de graphite et ils ont photographié l'image incandescente à l'aide d'un spectrographe à pièces optiques en quartz.

Grâce à la simplicité de cette technique et à la sensibilité de

(5) Spectrographic analysis of animal tissues, *Nature*, 1930, **126**, 682.

(6) A spectrographic analysis of human tissues, *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1608-1627.

(7) Spectrum analysis of hen eggs and chick tissues, *J. of Nutrit.*, 1935, **10**, 351.

(8) Spectrum analysis for trace elements in the ashes of human, goat and cow milk, *J. of Nutrit.*, 1938, **16**, 325-331.

(9) A spectrographic examination of the mineral content of human and other milk, *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1078.

l'analyse spectrale, ils ont pu atteindre commodément des résultats déjà très instructifs ; mais, il faut le remarquer, ces résultats ne permettent pas de répondre aux deux questions, qualitative et quantitative, que nous avons posées.

En effet, qualitativement, la méthode employée n'était pas encore assez sensible pour trancher tous les cas ; un certain nombre de ceux-ci (sang, lait, œuf de poule, divers invertébrés) sont même restés, en conséquence, dans l'incertitude ; quantitativement, d'autre part, surtout à cause de l'influence perturbatrice des substances contenues dans les cendres brutes sur l'intensité des raies du rubidium, il ne pouvait s'agir, dans la tentative de Sheldon et Ramage, que d'un ordre de grandeur plus ou moins approché, selon les expériences.

C'est pourquoi nous avons étendu aux espèces animales les déterminations que nous avons fait porter précédemment sur les espèces végétales (10). Malgré les difficultés de toutes sortes accrues par l'état de guerre, nous avons pu réunir des animaux et des organes animaux appartenant à d'assez nombreuses espèces d'Invertébrés et de Vertébrés pour permettre de jalonner d'une façon déjà assez variée la série zoologique (11).

Lorsque nos expériences ont eu pour objet des animaux entiers, les intestins ont été vidés de leur contenu, soit par le jeûne, comme pour le ver de terre et le scorpion, soit par dissection, comme pour la souris. Parmi les insectes, le ver à soie a été choisi à l'état de chrysalide, état dans lequel l'animal s'est débarrassé physiologiquement de son contenu intestinal.

Les prises totales ou partielles d'organes et celles de petits animaux ont été faites de manière à fournir chaque fois environ 2 g. de matière séchée à 105°. Le résidu, après dessiccation complète à l'étuve électrique, a été pesé exactement, puis incinéré dans une capsule de platine, à une température aussi basse que possible et, le plus ordinairement, en faisant intervenir un lessivage du charbon d'abord obtenu. Dans plusieurs cas, on a séché et incinéré des poids supérieurs de substances et l'on a poursuivi l'expérience sur une partie aliquote des cendres.

Nos recherches ont porté au total sur 37 échantillons d'animaux ou de parties d'animaux appartenant à 31 espèces. Grâce à la technique minutieuse, dont nous nous sommes servis, nous avons trouvé nettement le rubidium et réussi à le doser dans toutes les espèces animales que nous avons étudiées, aussi bien que dans

(10) *Loc. cit.* en (2).

(11) Nous tenons à remercier ici, pour les animaux ou parties d'animaux qu'ils nous ont aimablement procurés, MM. les professeurs Ch. PEREZ, de la Sorbonne (étoile de mer, ascidie) ; Ed. SERGENT, directeur de l'Institut Pasteur d'Alger (scorpion) et M. Ach. URBAIN, directeur du Muséum de Paris (cormoran, organes du cerf de Sibérie).

toutes les parties : langue, foie, pancréas, rein, muscles divers, sang, blanc et jaune de l'œuf, lait, provenant de ces espèces.

Voici les détails des résultats obtenus :

NOMS DES ANIMAUX OU ORGANES D'ANIMAUX	MATIÈRE SÈCHE p. 100	CENDRES p 100 matière sèche	K Na		RUBIDIUM en milligrammes matière sèche
			en grammes par kilogramme matière sèche	en grammes par kilogramme matière sèche	
Invertébrés :					
Etoile de mer (<i>Asterias glacialis</i> L.) entière	44,4	65,5	1,57	10,50	6,5
Ver de terre (<i>Lumbricus terrestris</i> L.) entier.	15,9	5,1	8,70	2,66	7,5
Coquille Saint-Jacques(<i>Pecten maximus</i> L.) sans la coquille.	17,0	8,3	13,90	8,25	15,4
Palourde (<i>Tapes decussatus</i> L.) sans la coquille	14,0	8,6	18,50	18,00	3,2
Escargot de jardin (<i>Helix pomatia</i> L.) sans la coquille.	13,4	7,5	3,20	4,84	5,2
Calmar (<i>Loligo vulgaris</i> Lam.) entier	22,8	8,4	11,20	6,37	7,2
Scorpion (<i>Buthus europæus</i> L.) entier		8,7	12,45	12,50	20,1
Crevette grise (<i>Crangon vulgaris</i> Fabr.) entière.	26,3	26,4	7,53	17,15	6,9
Langouste (<i>Palinurus vulgaris</i> Latr.) [muscle caudal]	21,9	14,1	7,62	38,30	28,1
Ver à soie (<i>Bombyx mori</i> L.) entier		3,9	13,30	0,20	3,7
Ver de farine (<i>Tenebrio molitor</i>) [larve entière].		5,1	11,70	1,64	3,1
Abeille domestique (<i>Apis mellifica</i> L.) entière	31,2	5,8	24,30	0,85	21,5
Ascidie (<i>Ascidia mentula</i> O.-F. Müller) entière	5,77	54,5	10,70	116,0	45,5
Vertébrés :					
Roussette (<i>Squalus canicula</i> L.) muscle caudal.	23,6	2,6	4,96	5,40	2,0
Dorade (<i>Chrysophrys aurata</i> Cuv. et Val.) [muscle caudal].	24,2	4,5	17,0	9,53	6,1
Merlan (<i>Gadus merlangus</i> L.) [muscle caudal]	22,5	8,9	13,15	5,84	6,3
Carpe (<i>Cyprinus carpio</i> L.) [muscle caudal]		5,4	17,0	1,90	9,7
Grondin (<i>Trigla cuculus</i> L.) [muscle caudal].	28,0	3,7	13,90	5,35	20,5
Crapaud (<i>Bufo vulg.</i> Dum. et Bibr.) [entier]	21,6	21,0	3,61	8,35	7,5
Tortue d'eau douce (<i>Cistuda europæa</i> Dum. et Bibr.) [muscles].		5,4	8,7	5,1	5,2
Dindon (<i>Meleagris gallopavo</i>) [jaune de l'œuf]		2,6	2,3	0,9	2,0
Moineau (<i>Fringila domestica</i> L.) [muscle pectoral].	26,0	3,7	13,3	1,5	29,0
Pigeon (<i>Columbus palumbus</i> L.) [muscle pectoral]	20,4	5,1	13,8	6,1	112,0
Coq (<i>Gallus domesticus</i>) muscle de la cuisse.	25,0		15,5	1,9	125,0
Cormoran (<i>Phalacrocorax carbo</i> L.) [muscle pectoral]	25,0	4,8	17,8	3,2	133,0
Cheval (<i>Equus caballus</i> L.) langue.	25,2		23,3	4,0	11,2
Cheval (<i>Equus caballus</i> L.) sang.			7,0	5,9	7,7
Génisse (<i>Bos taurus</i>) foie			12,2	3,7	65,5
Vache (<i>Bos taurus</i>) lait	11,5	6,2	13,1	1,3	38,5
Cerf de Sibérie (<i>Rusa ernicolor</i> Ker.) foie.	27,9	4,6	10,3	1,7	8,5
Cerf de Sibérie (<i>Rusa ernicolor</i> Ker.) pancréas.	21,6		29,7	8,8	24,0
Chat (<i>Felis domestica</i> Brisson) foie.	22,9		7,4	5,7	35,4
Lapin (<i>Lepus canniculus</i> L.) [muscle de la cuisse]	20,1	4,5	19,7	2,9	34,3
Lapin (<i>Lepus canniculus</i> L.) [rein].	19,6	6,3	13,2	9,9	13,7
Lapin (<i>Lepus canniculus</i> L.) [foie].	27,9	4,3	13,0	3,1	41,5
Souris grise (<i>Mus musculus</i> L.) [entière].	32,0	12,9	9,5	2,9	32,6

Les teneurs rencontrées varient beaucoup, comme chez les plantes et présentent le même caractère général d'être plutôt élevées, allant de quelques milligrammes à quelques centigrammes par kilogramme de matière sèche et pouvant atteindre, dans des cas il est vrai exceptionnels, plus d'un décigramme.

Les Invertébrés (13 résultats) nous ont fourni des chiffres allant de 3 à 28 mg. avec une exception très sensible pour un Tunicier : *Ascidia mentula*, qui en renfermait 45,5 mg.

Les Vertébrés que nous avons examinés se divisent jusqu'ici en deux ou plutôt en trois groupes : le premier, comprenant les Poissons, Batraciens et Reptiles, dans lequel les chiffres (6 résultats) sont restés entre 2 et 20,5 mg., à peu près comme chez les Invertébrés ; le deuxième, formé par les Mammifères (11 résultats) où les chiffres se sont élevés entre 8 et 65,5 mg., et enfin le troisième, celui des Oiseaux (6 résultats), dans lequel nous avons eu la surprise de rencontrer jusqu'à plus de 100 mg. Il s'agissait alors de muscles, principalement du muscle pectoral, qui, chez le pigeon, le coq et le cormoran, atteint respectivement les teneurs de 112, 125 et 133 mg. de rubidium par kilogramme de matière sèche. Cette particularité incite fortement à supposer que le rubidium doit intervenir dans le phénomène de contraction musculaire et, sans doute, à cause de sa relativement haute radio-activité.

Quoi qu'il en soit de la valeur des quelques observations particulières qui viennent d'être relevées et qui ne reposent encore que sur un trop petit nombre de résultats pour être considérées comme définitives, il ressort de l'ensemble de nos nouvelles recherches que *le rubidium est aussi généralement répandu dans les espèces animales que dans les espèces végétales et qu'il doit être compris désormais parmi les éléments constants de la matière vivante.*

SUR UN PROCESSUS DE DÉFENSE DU MILIEU HABITÉ PAR DES ESPÈCES VIVANTES A L'AIDE D'UNE SUBSTANCE TOXIQUE

par GABRIEL BERTRAND.

La découverte de la pénicilline n'a pas seulement enrichi d'une manière très importante l'art de guérir, elle évoque, selon moi, d'une manière particulièrement frappante, une fonction biologique non encore envisagée et cependant assez répandue dans le monde vivant, végétal et animal.

On sait en quoi consiste cette découverte : des germes d'une moisissure, reconnue plus tard comme étant le *Penicillium notatum*, s'étant développés à la surface d'une culture de staphylocoques en milieu nutritif gélosé, il apparut autour de la colonie mycélienne une zone transparente, de plus en plus large, par disparition des cellules du staphylocoque. Ce phénomène observé en 1924, par Sir Alexander Fleming (1) et étudié par lui avec persévérance, fut reconnu comme résultant de la sécrétion par la moisissure d'une sorte de toxine, laquelle se répand de proche en proche dans la gélose et détruit le microbe qu'on y cultivait. Ensemencé à la surface d'un liquide nutritif approprié, le *Penicillium notatum* se comporte comme sur la gélose, sa toxine passe et s'accumule dans le liquide d'où on l'extraît aujourd'hui en grand sous le nom de *pénicilline*. Celle-ci, introduite à son tour dans des cultures, naturelles ou artificielles, même animales ou humaines, agit sélectivement sur certains microbes, plus spécialement sur des microbes du groupe des

(1) *Brit. J. exp. Path.*, 1929, **10**, 226. A propos de la pénicilline, on a cité comme antériorité à la découverte de cette substance une publication de PASTEUR et JOUBERT (*C. R. Acad. Sci.*, 1877, **85**, 101) et une autre de FORTINEAU (*C. R. Acad. Sci.*, 1910, **150**, 1454). En se rapportant aux textes de ces savants, on voit qu'il s'agit dans les deux publications de tout autre chose que de la production d'une substance directement bactéricide. PASTEUR et JOUBERT envisageaient bien un cas de concurrence vitale, mais c'était celui de la Bactéridie charbonneuse et de microbes communs, d'espèces non précisées, quant à la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu de culture. La publication de FORTINEAU avait trait, de son côté, à la destruction de la même Bactéridie par vaccination à l'aide du bacille pyocyanique ou de sa toxine.

cocci. On l'utilise aujourd'hui avec succès contre diverses maladies, dont quelques-unes étaient avant sans remède.

On n'a pas manqué de rechercher si d'autres espèces végétales étaient capables de sécréter de la pénicilline. On en a déjà reconnu plusieurs, dont l'action est plus ou moins marquée, en étudiant d'abord des moisissures du genre *Penicillium*, puis des moisissures de genres différents. Avec le *Penicillium notatum* qui en est le type, ces différentes espèces appartiennent à l'ordre des Ascomycètes de la classe des Champignons, et l'on remarquera que leur action se limite, jusqu'ici, à des Bactériacées, admises communément parmi les végétaux dans la classe des Algues.

Au type du *Penicillium notatum*, il paraît convenable de rattacher l'espèce de Basidiomycètes du genre *Clitocybe*, provenant d'un rond de sorcières, qui a été signalé par Ch. Hollande dans une séance récente de l'Académie des Sciences (2).

En outre, il y a lieu de retenir, d'après une information publiée dans un journal étranger, que l'on aurait trouvé aussi une activité réduite de pénicilline à un Lichen ; mais les végétaux de cette sorte sont, comme on sait, des associations à bénéfice réciproque d'un Champignon et d'une Algue ; il serait intéressant de déterminer si la pénicilline provient du Champignon ou de l'Algue ou, peut-être même, de chacun des deux associés.

Tous les végétaux qui viennent d'être mentionnés appartiennent aux Cryptogames. Existe-t-il des espèces analogues chez les Phanérogames ? A la condition de ne retenir des exemples énumérés que ce qu'ils renferment de commun et de plus général, à savoir le processus de défense du milieu vital contre des espèces concurrentes à l'aide d'une substance toxique, on peut répondre positivement.

C'est ainsi que je crois pouvoir proposer comme type de Phanérogames celui du *Pinus maritima*, auquel appartiennent d'autres espèces de Pins et de Conifères. Les botanistes, les forestiers et les mycologues savent que dans les pinèdes et les agglomérations d'arbres à aiguilles, il n'existe qu'une flore très réduite, non seulement quant au nombre des individus mais, ce qui est plus caractéristique, quant au nombre des espèces. Cette particularité est due à plusieurs causes : d'abord à l'atténuation des radiations solaires et à la composition organique du sol, causes qui sont communes à d'autres agglomérations sylvestres, et, particulièrement ici, à ce que les Conifères sécrètent des produits volatils, parmi lesquels existent des carbures terpéniques, aux vapeurs desquels sont plus ou moins sensibles un grand nombre d'espèces végétales.

(2) Du 24 septembre 1945, mais il faudra attendre que cette communication soit publiée pour en connaître exactement la teneur.

Dans le cas du Pin maritime et des plantes de ce type, la fonction de défense du milieu vital ne s'exerce plus à l'aide d'une substance soluble dans l'eau, comme lorsqu'il s'agit des Champignons du type du *Penicillium notatum*, mais grâce à une substance volatile ; le résultat final est néanmoins le même : l'espèce agressive est protégée des espèces concurrentes par un toxique susceptible de se diffuser autour de son point d'émission jusqu'à une distance d'autant plus grande que sa concentration est plus forte et la sensibilité des espèces étrangères plus accentuée.

La fonction de défense d'une espèce contre une autre par empoisonnement du milieu vital, que je proposerai d'appeler *télétoxie*, n'est pas limitée au règne végétal ; j'ai eu l'occasion d'en observer un premier exemple, d'ailleurs très démonstratif, dans le règne animal, lorsque j'étudiais, en collaboration avec mon ami C. Phisalix, la composition et les propriétés physiologiques du venin du Crapaud commun. Il arriva qu'un petit nombre de ces animaux, ayant été apportés en fin de journée au laboratoire, fut placé dans le premier des compartiments, creusés dans un long bloc d'ardoise, qui servait d'aquarium pour les Grenouilles. Ces compartiments, peu profonds, communiquaient les uns avec les autres et un petit filet d'eau les alimentait. Or, le lendemain matin toutes les Grenouilles étaient mortes (3).

Bien que les glandes à venin du Crapaud soient d'ordinaire sans communication avec l'extérieur, la première hypothèse pour expliquer cette mort massive et inattendue était le passage, par un moyen quelconque, des substances actives du venin des Crapauds dans l'eau où baignaient ensuite les Grenouilles ; mais on pouvait également se demander s'il n'était pas survenu une contamination accidentelle de l'eau de la canalisation à laquelle les Crapauds auraient résisté, mais non les autres Batraciens. Une expérience, consistant à mettre les Crapauds dans un compartiment du milieu et de nouvelles Grenouilles dans les autres, a montré que mouraient seules les Grenouilles situées en aval des Crapauds, autrement dit que l'eau n'intervenait qu'en transportant des substances toxiques émises par ces derniers animaux (4).

A l'autopsie, le cœur des Grenouilles mortes était fortement contracté, signe caractéristique de l'action de la bufotaline. Le venin qui passe des glandes dans le sang s'élimine en partie par l'urine et peut alors se répandre dans l'eau. Une injection d'urine

(3) Il s'agissait, si j'ai bonne mémoire — c'était en 1893 — de *Rana temporaria*.

(4) J'ai déjà eu l'occasion de citer cette observation à propos d'une intéressante publication de Jean ROSTAND sur la fécondation croisée non réciproque du Crapaud et de la Grenouille (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, 412, 1140).

de Crapaud dans le sac dorsal d'une Grenouille l'a tuée avec tous les symptômes de l'intoxication directe par le venin.

Selon toute probabilité, dans les conditions naturelles d'existence des Batraciens, c'est au moment de la reproduction que la sécrétion venimeuse intervient pour interdire aux Grenouilles le milieu vital du Crapaud. L'accouplement de l'une comme de l'autre de ces espèces a lieu, au début de l'année, au sein des mares et des fossés garnis d'eau. Après la ponte et la fertilisation des œufs, ceux-ci sont abandonnés par les parents à l'éclosion et les têtards évoluent dans le liquide jusqu'à leur transformation en individus adaptés à la vie terrestre. Mais là où se sont installés des Crapauds, il ne peut y avoir de Grenouilles et, depuis l'accouplement des parents jusqu'à l'atterrissage de petits crapauds, la première espèce n'a à subir aucune concurrence de la seconde.

Etant donné les nombreuses espèces de Batraciens répandues par le monde, dont la physiologie et les mœurs se rapprochent de celles du Crapaud commun et de la Grenouille, il est probable que l'on trouvera facilement parmi elles de nouveaux exemples de défense du milieu vital à l'aide de sécrétions toxiques. A cet égard, je puis déjà signaler que, dans une note publiée en 1851, P. Gratiolet et S. Clœz ont mentionné que « plusieurs Grenouilles, placées dans un tonneau avec des Salamandres, furent trouvées mortes au bout de huit jours » (5). Il s'agissait évidemment là d'un cas de télétoxie par les alcaloïdes du venin de la Salamandre.

En résumé, le rapprochement de certaines observations d'origines diverses révèle l'existence d'une fonction biologique chez les plantes et chez les animaux qui était restée jusqu'ici inaperçue et dont on peut déjà citer des exemples chez les Cryptogames, les Phanérogames et les Batraciens. Cette fonction consiste dans la production par les espèces considérées de substances qui se répandent dans le milieu leur servant d'habitat et atteignent, en les empoisonnant, d'autres espèces qui pourraient leur faire concurrence. Il ne s'agit pas ici d'un moyen de défense individuel, dont beaucoup de plantes et d'animaux sont armés, mais d'un processus d'une portée plus étendue, aboutissant à la protection d'une espèce contre d'autres espèces, et cela par l'action directe et distante d'un poison.

(5) *C. R. Acad. Sci.*, 1851, **32**, 592.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (15^e.)

Séance du 7 mars 1946.

Présidence de M. NÈGRE.

COMMUNICATIONS

NOUVELLES RECHERCHES SUR LE TITRAGE DES SÉRUMS ANTI-VIBRIION SEPTIQUE

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FABRE.

Dans un travail antérieur (1), nous avons utilisé 7 échantillons non hémolytiques de toxine vibriion septique pour déterminer, par le procédé des injections intraveineuses à la souris, le titre antitoxique de divers sérums anti-vibriion septique. Toutes les toxines ont été préparées en bouillon Vf avec la même souche de *Cl. septicum* : la souche Feuntén. Nous avons constaté que les valeurs antitoxiques attribuées à un même sérum, au cours des titrages effectués comparativement avec plusieurs échantillons de toxine, différaient généralement peu entre elles. Par contre, les résultats des titrages réalisés avec d'autres échantillons présentaient des écarts de 25 p. 100 ; des divergences aussi fortes incitaient à supposer, d'une part, que les toxines utilisées dans ces derniers dosages contenaient plusieurs antigènes dans des proportions inégales et, d'autre part, qu'il existait plusieurs anticorps dans les sérums anti-vibriion septique en dehors des anti-hémolysines.

En étudiant ensuite les propriétés d'une toxine élaborée par un anaérobie cilié et myolytique dont nous recherchions la nature, nous avons mis en évidence que beaucoup de sérums anti-vibriion septique neutralisent l'exotoxine du *Cl. histolyticum* et ainsi étayé l'hypothèse de la complexité des sérums anti-vibriion septique et de la toxine du *Cl. septicum*. Voici quelques résultats :

Action des sérums anti-vibriion septique sur les toxines vibriion septique et histolytique. — Nous avons déterminé le titre antitoxique de 12 sérums anti-vibriion septique fournis par 10 chevaux immunisés avec l'exotoxine de la souche Feuntén : chevaux 596, 592, 104, FJ 1, 638, 595, 531, 547, 92, 97. Nous avons désigné par 596 a, 596 b et 596 c le sérum de

(1) MAYLIS GUILLAUMIE, ces *Annales*, 1941, 67, 112 à 153.

3 saignées faites en 1944, 1945 et 1946 au cheval 596 maintenu en état d'immunisation par 2 inoculations mensuelles de toxine vibriion septique centrifugée. Nous avons en outre titré le sérum étalon anti-vibriion septique danois préparé avec du sérum anti-Feunten puis le sérum étalon anglais et un sérum allemand provenant d'animaux immunisés contre des souches de *Cl. septicum* autres que celle dont nous disposons.

La détermination du titre anti-vibriion septique des sérums a été faite sur souris, vis-à-vis de la dose L+ des échantillons V 2, V 4, V 6, V 7 ou V 10 de toxine vibriion septique préparés avec la souche Feunten et vis-à-vis de la toxine V d 1 que nous avons préparée avec une souche danoise de *Cl. septicum* qui nous a été obligeamment donnée par M. Ipsen. Les résultats sont donc exprimés en unités internationales. La dose L+ de l'échantillon V 10 que nous utilisons le plus souvent représente actuellement 35 doses mortelles (D. M.) pour la souris (veines). Selon l'usage, nous considérons comme dose mortelle, le poids de toxine qui tue la moitié des souris de 17 à 20 g. injectées dans les veines ; une quantité double de toxine provoque à coup sûr la mort de toutes les souris.

Activité antitoxique, exprimée en unités internationales, de 9 sérums anti-vibriion septique titrés en présence de différentes préparations de toxine de *Cl. septicum* et de *Cl. histolyticum*.

SÉRUMS anti-vibriion septique	ACTIVITÉ anti-vibriion septique		ACTIVITÉ ANTI-HISTOLYTIQUE (exprimée en unités internationales) Titrages en présence des toxines histolytiques :			
	Titre international (unités)	vis à vis des toxines vibriion septique	H ₆	A ₃₄	Hd ₁	Hd ₃
596 a	200	V ₁₀			45	
596 b	300	V ₁₀	60	70	60	60
596 c	250	V ₁₀			70 à 80	
	250 à 300	Vd ₁				
104	400 à 450	V ₄ , V ₆ , V ₇	10	12 à 14	14	12 à 14
	450	V ₁₀				
	600 à 700	Vd ₁				
FJ ₁	450	V ₂	6	10		8
	350 à 400	V ₆				
638	550 à 600	V ₁₀	10	12 à 14	14 à 16	
3.250	600	V ₁₀		12	11 à 13	
97	100	V ₁₀	1			
547	50	V ₁₀			1	

Pour évaluer le pouvoir anti-histolytique des 15 sérums énumérés précédemment, nous avons employé 5 toxines histolytiques précipitées par le sulfate neutre d'ammonium : la toxine H 6 engendrée par la souche Letivi, la toxine A 34 reçue de Copenhague et 3 toxines

non hémolytiques H d 1, H d 2, H d 3 que nous avons préparées dans du bouillon Vf avec une souche danoise de *Cl. histolyticum*. Comme dose d'épreuve de ces différentes toxines nous avons utilisé, soit leur dose L+ précisée avec le sérum étalon anti-histolytique danois, soit 2 à 11 D. M. de toxine. La dose L+ de la toxine H 6 représente 38 D. M. (souris, veines) et celle de la toxine H d 1 en représente 47.

Dans nos expériences, des volumes décroissants du sérum à éprouver sont additionnés de toxine et, après un séjour de quarante-cinq à soixante minutes dans une étuve à 37°, les mélanges sont injectés par voie veineuse à des souris blanches de 17 à 20 g. Les animaux sont observés pendant deux à trois jours. Par définition, le plus petit volume de sérum qui en présence de la dose d'épreuve de toxine protège la moitié des souris inoculées, indique le degré d'activité du sérum. D'après nos résultats, 14 sérums anti-vibrien septique sur les 15 sérums examinés, neutralisent la toxine histolytique. Nous indiquons quelques valeurs antitoxiques dans le tableau suivant. Le sérum 596 b, par exemple, titre 300 unités anti-vibrien septique et — d'après les titrages avec les toxines histolytiques H 6, H d 1, H d 3 — 60 unités internationales anti-histolytiques ; le sérum 638 et le sérum allemand 3250 contiennent 550 à 600 unités anti-vibrien septique et seulement 11 à 13 unités internationales anti-histolytiques. Les sérums 104 et FJ 1 sont comparables aux sérums 638 et 3250 par leur teneur en antitoxine histolytique.

Les sérums suivants sont actifs contre la toxine histolytique, mais beaucoup moins que les précédents : pour les titrer, nous avons dû employer 2 à 11 D. M. seulement de toxine. Si au cours d'un dosage, la moitié des souris survit à l'injection d'un mélange contenant par exemple 0,1 cm³ de sérum et 2 D. M. de toxine, ce fait est conventionnellement exprimé en disant que le sérum à la dose de 0,1 cm³ neutralise 2 D. M. de la toxine employée (2). Ceci étant posé, indiquons les résultats de divers titrages. Pour neutraliser 2 D. M. de la toxine histolytique H d 1 il faut 0,1 cm³ du sérum 595 et 0,2 cm³ du sérum 531 dont les titres anti-vibrien septique sont compris entre 100 et 150 unités. L'étalon anti-vibrien septique anglais G. G. V.S. 21 contient 50 unités anti-vibrien septique par centimètre cube, d'après les titrages que nous avons effectués avec la toxine vibrien septique V 10 préparée avec la souche Feuntun et d'après ceux qui ont été faits à Londres avec l'exotoxine d'une autre souche de *Cl. septicum* ; ce sérum neutralise, à la dose de 0,05 cm³, 2 D. M. de la toxine histolytique H 6 ; à la dose de 0,02 cm³, il neutralise 2 D. M. 1/2 de la toxine A 34 et 3 D. M. de la toxine H d 1. L'étalon anti-vibrien septique provenant de Copenhague titre aussi 50 unités anti-vibrien septique ; il neutralise à la dose de 1/15 de centimètre cube, 2 D. M. de toxine H 6 ; à la dose de 0,02 cm³ il neutralise 2 D. M. 1/2 de toxine A 34 et à la dose de 0,05 cm³, 2 D. M. de toxine H d 1. Avant l'immunisation, le cheval 97 fournissait un sérum qui, à la dose de 0,5 cm³, ne neutralisait pas 2 D. M. de toxine H 6. Après des injections répétées de toxine vibrien septique (Feuntun) son sérum titre 200 à 250 unités anti-vibrien septique et à la dose de 0,2 cm³ il inhibe 6 D. M. de toxine histolytique H 6. Le

(2) L'expérience montre qu'un volume de sérum légèrement plus grand protège toutes les souris contre cette dose de toxine.

sérum 547, à la dose de 0,25 cm³, neutralise 11 D. M. de toxine H d 1.

Rappelons, par contraste, que les sérums anti-*perfringens* (3) et les sérums normaux (4) de cheval, employés à la dose de 0,5 cm³, neutralisent rarement 2 D. M. de toxine histolytique. Ainsi, un seul sérum anti-*perfringens* sur les 15 que nous avons maintenant éprouvés, a neutralisé, à la dose de 0,5 cm³ 2 D. M. de toxine histolytique ; les 14 autres ont été inefficaces.

Voici enfin quelques observations au sujet des sérums anti-vibron septique 596 a et 592 prélevés le même jour aux chevaux respectifs 596 et 592 immunisés simultanément et rigoureusement dans les mêmes conditions : alors que le sérum 596 a est très antitoxique vis-à-vis des toxines vibron septique et histolytique (v. tableau), le sérum 592 titre seulement 125 unités anti-vibron septique et son activité vis-à-vis de la toxine histolytique est inappréciable ; en effet, à la dose de 0,2 cm³ il ne neutralise pas 2 D. M. de la toxine H d 1. Pour expliquer les résultats opposés obtenus à l'égard de la toxine histolytique avec les sérums 596 a et 592 on peut penser que l'affinité du deuxième est nulle pour la toxine du *Cl. histolyticum* ; nous supposons plutôt que le sérum 592 est déficient en un anticorps particulier et nous considérons que cet anticorps indispensable à la neutralisation d'une toxine histolytique non hémolytique est présent en quantité abondante dans le sérum 596 a ; faisons remarquer qu'il existe à un taux encore plus élevé dans le sérum 596 c fourni par le cheval 596 vingt mois après le sérum 596 a (v. tableau).

Dans une note ultérieure, au cours de laquelle nous examinerons les propriétés des sérums anti-histolytiques, nous schématiserons comparativement la composition des sérums anti-vibron septique et anti-histolytiques.

Pouvoir préventif des sérums anti-vibron septique. — Weinberg et Seguin (5) ont signalé que l'injection sous-cutanée de sérum anti-vibron septique protège contre l'inoculation sous-cutanée ultérieure de la toxine et de la culture du vibron septique. Nous avons constaté que le sérum anti-vibron septique FJ 1 possède un pouvoir préventif net non seulement contre l'inoculation intraveineuse de 2 D. M. de toxine vibron septique mais aussi contre 2 D. M. de toxine histolytique introduites dans les veines trente minutes après l'injection sous-cutanée du sérum.

Pouvoir agglutinant des sérums anti-vibron septique. — Après avoir constaté que de nombreux sérums anti-vibron septique neutralisent la toxine histolytique, nous avons recherché à quel taux ils agglutinent des suspensions en eau physiologique de *Cl. septicum* (Feunten) ou de *Cl. histolyticum* (souches Letivi et danoise). Au cours de ces recherches, nous avons titré des sérums antitoxiques de chevaux immunisés contre les antigènes de la souche Feunten ou des sérums de lapins ayant reçu, par voie veineuse, des quantités croissantes d'une suspension de *Cl. septicum* chauffée à 60°, faite avec les germes d'une culture en bouillon Vf que nous avons préparée avec la souche Feunten. Les séries

(3) MAYLIS GUILLAUMIE, ces *Annales*, 1942, 68, 84 à 89.

(4) MAYLIS GUILLAUMIE, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, 138, 68.

(5) M. WEINBERG et P. SEGUIN, *La gangrène gazeuse*, Masson, Editeur, 1917 (Paris).

de tubes qui sont préparées pour les dosages sont laissées pendant quatre heures à 37°-38° et pendant vingt heures à la température du laboratoire. Les tubes sont examinés à la sortie de l'étuve et le lendemain.

En quatre heures à 37-38°, tous les immunsérums agglutinent fortement la souche Feunten et, dans la moitié des cas, n'agglutinent pas le *Cl. histolyticum*. Les résultats notés vingt-quatre heures plus tard montrent que la souche histolytique danoise n'est pas toujours agglutinée par les sérums ; dans les cas où l'agglutination a lieu, le titre agglutinant des immunsérums n'est pas supérieur, vis-à-vis de cette souche, à celui des différents sérums normaux examinés en même temps. Exemple : Après 6 inoculations au lapin 327, le titre agglutinant est de 200.000 vis-à-vis du *Cl. septicum* (Feunten) et de 100 vis-à-vis du *Cl. histolyticum* (souche danoise). Avant l'immunisation, le titre agglutinant vis-à-vis de cette souche était aussi égal à 100. Les sérums de chevaux 596 b et 638 sont actifs à 1/10.000 vis-à-vis de la souche Feunten et respectivement à 1/750 et 1/500 vis-à-vis de la souche histolytique danoise ; le sérum 596 b est actif à 1/500 vis-à-vis de la souche Letivi (lecture de vingt-quatre heures).

En résumé, de nombreux sérums anti-vibron septique neutralisent l'exotoxine de différentes souches de *Cl. histolyticum* ; leur teneur en antitoxine histolytique est fréquemment élevée. De tels sérums produisent quelquefois une agglutination dans les suspensions de *Cl. histolyticum*, mais leur pouvoir agglutinant n'est pas supérieur à celui de certains sérums normaux.

PROPRIÉTÉS DES SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES. ANTIGÈNES ÉLABORÉS PAR DIFFÉRENTES SOUCHES DE *CL. HISTOLYTIUM* ET DE *CL. SEPTICUM*

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FABRE.

Dans la note précédente nous avons signalé que différents sérums anti-vibron septique inhibent la nocivité de la toxine histolytique (1). Ce fait indique, à la fois, une nouvelle propriété des sérums anti-vibron septique et la complexité de la toxine vibron septique employée pour l'immunisation des chevaux producteurs des sérums examinés.

Pour nous rendre compte si, réciproquement, les sérums anti-histolytiques provenant de chevaux préparés contre l'exotoxine du *Cl. histolyticum* sont capables de neutraliser la toxine vibron septique, nous avons titré plusieurs de ces immunsérums par le procédé des injections intraveineuses à la souris ; puis nous avons déterminé, *in vitro*, leur activité anti-hémolytique et leur pouvoir agglutinant.

I. ACTION DES SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES SUR LES TOXINES HISTOLYTIQUE ET VIBRON SEPTIQUE (Titrages sur souris). — Nous avons comparé l'acti-

(1) MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FABRE, *ces Annales*, 1946, **72**, 814.

vité antitoxique de 14 sérums anti-histolytiques : 7 sérums de chevaux qui ont été immunisés contre les antigènes de la même souche de *Cl. histolyticum*, la souche Letivi (sérums 145, 308, 45.043, 827 a, 827 b, 408 a, 408 b) ; 4 sérums de chevaux immunisés contre les antigènes que nous avons préparés avec une souche danoise de *Cl. histolyticum* (sérums 600 a et 600 b respectivement prélevés deux et six mois après le début de l'immunisation du cheval 600 ; sérums 601 a et 601 b provenant du cheval 601 après deux et six mois d'immunisation) ; un sérum allemand (5681), l'étalon anglais GG H 13 et l'étalon danois H I 18 ou H I 21. Pour faire les dosages et noter les résultats, nous avons procédé comme dans le travail précédent (2).

Le titre anti-histolytique est toujours déterminé vis-à-vis de la dose L+ de la toxine H 6 élaborée par la souche Letivi et, occasionnellement, vis-à-vis de la dose L+ des toxines H d 1 et H d 3 préparées avec la souche histolytique danoise. La dose L+ de toutes ces toxines est précisée avec l'étalon anti-histolytique danois. L'activité anti-vibron septique est recherchée en présence de quantités variables de la toxine non hémolytique V 10 engendrée par notre souche habituelle de *Cl. septicum*, la souche Feunten, ainsi qu'en présence de la toxine V d 1 préparée avec une souche danoise de *Cl. septicum*. Une unité antitoxique de l'étalon anti-histolytique danois, c'est-à-dire 0,05 cm³ de ce sérum, neutralise 38 doses mortelles (D. M.) de la toxine H 6.

Résultats. Tous les sérums anti-histolytiques, sauf les sérums 600 a et 601 a, neutralisent une quantité plus ou moins grande de toxine vibron septique.

Les sérums 145, 308, 408 b et 45.043 sont particulièrement efficaces (tableau). Le sérum 145, par exemple, neutralise, à la dose de 1/3 de

Activité antitoxique, exprimée en unités internationales, de 5 sérums anti-histolytiques titrés en présence de différentes préparations de toxine du *Cl. histolyticum* et du *Cl. septicum*.

SÉRUMS anti- histolytiques	ACTIVITÉ ANTI-HISTOLYTIQUE Titration en présence des toxines histolytiques			ACTIVITÉ ANTI-VIBRION SEPTIQUE Titration en présence des toxines vibron septique	
	H ₆ (unités)	Hd ₁ (unités)	Hd ₃ (unités)	V ₁₀ (unités)	Vd ₁ (unités)
145	250			1,5	
308	400	450-500	400-450	10	10
408 b	125-150				8
45.043	250-300	350-400	250-300	10-12	12
600 b	90-100	90-100	90-100	1,25 à 1,5	1,25

centimètre cube, 17 D. M. de la toxine V 10. Le sérum 308, à la dose de 0,1 cm³, neutralise la dose L+ de la toxine vibron septique V 10, c'est-à-dire 35 D. M. de cette toxine ; à la dose de 0,1 cm³ il neutralise

aussi la dose de L+ de la toxine V d 1 ; son titre anti-histolytique est de 400 à 450 unités d'après les titrages effectués avec les toxines H 6 et H d 3. Le sérum 45.043 titre 250 à 300 unités anti-histolytiques (titrages avec les toxines H 6 et H d 3) et 10 à 12 unités anti-vibron septique (titrages avec V 10 et V d 1).

A la dose de 0,05 cm³, l'étalon anti-histolytique danois neutralise 2 D. M. des toxines vibron septique V 10 et V d 1 ; 0,05 cm³ de l'étalon anglais et du sérum allemand neutralisent 2 D. M. 1/2 de la toxine V. 10 (3). Les deux étalons titrent 20 unités anti-histolytiques et le sérum allemand : 200. Pour neutraliser 2 D. M. de la toxine V 10, il faut 0,2 cm³ du sérum 827 a et 0,05 cm³ du sérum 827 b fournis à un mois d'intervalle par le cheval 827 ; ces 2 sérums titrent respectivement 50 et 75 unités anti-histolytiques ; il suffit de 0,02 cm³ du sérum 600 b pour supprimer totalement la nocivité de 2 D. M. des toxines V 10 et V d 1 ; ce sérum titre 90 à 100 unités anti-histolytiques d'après les titrages faits avec les toxines H 6, H d 1 et H d 3.

Quant aux sérums 600 a et 601 a, prélevés aux chevaux 600 et 601 deux mois seulement après le début de l'immunisation, ils ne neutralisent pas, même à la dose de 0,5 cm³, 2 D. M. de la toxine V 10. Le premier titrait alors 10 unités anti-histolytiques et le second 150 à 200. Les sérums 600 b et 601 b, fournis quatre mois plus tard par ces deux chevaux, sont capables de se fixer sur la toxine vibron septique et de la neutraliser. Par conséquent, au cours de l'immunisation prolongée, les sérums acquièrent une nouvelle propriété : leur teneur en antitoxine vibron septique atteint alors un taux décelable ; nous avons indiqué ci-dessus l'activité de l'un d'eux, celle du sérum 600 b.

Dans un but de comparaison, nous avons recherché si les sérums anti-œdématisants neutralisent la toxine vibron septique. Les 6 sérums que nous avons employés à la dose de 0,1 cm³, n'ont pas supprimé la nocivité de 2 D. M. de la toxine V 10 : aucune souris n'a survécu aux inoculations intraveineuses faites quarante-cinq minutes après avoir préparé les mélanges de sérum et de toxine.

Interprétation. — Pour schématiser les résultats précédents, nous désignons par des symboles les antigènes non hémolytiques que nous supposons dans les toxines du *Cl. septicum* et du *Cl. histolyticum* : nous dénommons σ (*sigma*) l'antigène dominant de la toxine vibron septique et τ (*tau*) l'antigène caractéristique de la toxine histolytique. Nous pensons que la toxine vibron septique contient les antigènes non hémolytiques σ et τ (τ en très faible quantité) ; la toxine histolytique contiendrait aussi ces antigènes, mais τ à l'état dominant et σ à l'état de traces.

Les sérums anti-histolytiques 145, 308 b et 45.043 renfermeraient beaucoup d'antitoxine τ et des quantités notables d'antitoxines σ ; les sérums G G II 13, H I 18, H I 21, 5681 contiendraient de l'antitoxine τ et de faibles quantités d'antitoxine σ . Les sérums 600 a et 601 a contiennent aussi les antitoxines τ et σ puisqu'ils neutralisent les toxines H 6, H d 1, H d 3, mais si peu d'antitoxine σ qu'ils ne peuvent neutraliser

(3) Nous nous sommes assurées que la quantité de glycérine présente dans 0,05 cm³ des sérums étalons ne protège aucune souris contre 2 D. M. de toxine V d 1 (le mélange de toxine et de glycérine est injecté dans les veines quarante-cinq minutes après sa préparation).

la quantité d'antigène σ qui existe dans 2 D. M. de toxine vibron septique.

Ce mode de représentation des résultats permet d'expliquer l'inégale activité des sérums anti-vibron septique que nous avons mentionnée dans la note précédente. Les sérums 596 a, 596 b, 596 c sont riches en antitoxines σ et τ ; les sérums 104, FJ 1, 638 contiennent beaucoup d'antitoxine σ et une faible quantité d'antitoxine τ . Le sérum 592 contient un taux important d'antitoxine σ , des traces seulement d'antitoxine τ (très efficace contre la toxine vibron septique, il ne neutralise même pas 2 D. M. de toxine histolytique à la dose de 0,2 cm³).

Remarques. — a) En déterminant, sur souris (veines), le poids L'+ de la toxine histolytique H d 1 qui est neutralisé par 1/200 de centimètre cube du sérum 596 a dont le titre anti-vibron septique est de 200 unités par centimètre cube, et en recherchant par le procédé des injections intradermiques au cobaye le poids L'N/10 de cette toxine qui est neutralisé par 1/2.000 de centimètre cube du sérum 596 a, nous avons obtenu des résultats permettant de penser qu'il existe en outre un antigène léthal non nécrosant dans cette préparation non hémolytique de toxine histolytique. Etant donné que de nombreux sérums anti-vibron septique et anti-histolytiques neutralisent la toxine H d 1, il y a lieu d'envisager la présence de cet antigène dans les toxines vibron septique et histolytique utilisées pour immuniser les chevaux qui ont fourni ces sérums et de présumer l'existence de l'anticorps correspondant dans les sérums anti-vibron septique et anti-histolytiques les plus complexes. Cet antigène pourrait être désigné par la lettre v (*upsilonn*).

b) Les souches de *Cl. histolyticum* et *septicum* que nous avons utilisées au cours de ces recherches ont été ensemencées dans des bouillons Vf glucosés, ajustés à pH 7,6 ; nous avons observé les caractères classiques suivants : les cultures de *Cl. histolyticum* sont légèrement alcalines vingt heures après l'ensemencement ; en se multipliant, le *Cl. histolyticum* rend le bouillon nettement trouble, mais il ne produit pas de gaz ou des quantités minimales. En injection intramusculaire, les cultures histolytiques déterminent l'histolyse totale des muscles injectés et la mort rapide des cobayes inoculés.

Le *Cl. septicum* acidifie fortement le bouillon Vf glucosé à 5 p. 1.000 ; le pH des cultures de vingt heures est de 5,3-5,6. Pendant leur développement, les germes font apparaître un trouble prononcé dans le bouillon et suscitent un abondant dégagement gazeux. Les cultures injectées dans les muscles provoquent rapidement la mort des cobayes ; à l'autopsie, on constate un œdème hémorragique sans trace de myolyse.

Ces divers caractères différencient nettement le *Cl. septicum* du *Cl. histolyticum*. Les résultats que nous avons observés en procédant à l'étude sérologique des toxines non hémolytiques élaborées par ces deux germes, nous ont amenées à admettre que ces toxines contiennent les mêmes antigènes, mais à des taux très inégaux. Si l'on songe à présent aux faits bien connus sur les analogies de constitution qui existent entre les toxines engendrées par les *Cl. perfringens* des types A (myolytiques), B (non myolytiques), C et D, on est tenté de considérer que le *Cl. septicum* et le *Cl. histolyticum* sont deux types distincts d'un même genre microbien, remarquable non seulement par ses carac-

tères morphologiques bien définis mais encore par les antigènes qu'il produit.

c) En thérapeutique, il est évidemment désirable d'utiliser des sérums possédant de multiples propriétés. Pour les usages bactériologiques, l'emploi des sérums monovalents est, par contre, préférable parce qu'avec de tels sérums le diagnostic des germes à identifier est plus facile. Lorsqu'on ignore si le sérum anti-histolytique dont on dispose contient de l'antitoxine vibron septique et si un sérum anti-vibron septique renferme de l'antitoxine histolytique, il convient d'être prudent dans l'interprétation des résultats fournis par la réaction toxine-antitoxine. Dans le cas où les souris survivent à l'injection intraveineuse d'un mélange contenant, par exemple, du sérum anti-vibron septique et une toxine inconnue élaborée par un anaérobie cilié, il faut examiner, avant de conclure, les lésions causées par le germe producteur de la toxine étudiée ; il est nécessaire en outre de noter si les cultures sont fortement gazogènes et si l'injection intraveineuse d'une dose minima mortelle de toxine tue les souris d'une manière foudroyante ou après un délai assez long.

Pour compléter le diagnostic par l'épreuve de l'agglutination, il faut posséder divers sérums agglutinants, car, rappelons-le, Weinberg et Seguin ont supposé qu'il existe plusieurs races sérologiques de *Cl. histolyticum* ; M. Robertson (4), par des titrages d'agglutination, a distingué 4 races sérologiques de *Cl. septicum* ; Davesne (5) a précisé qu'il en existait 6, Konno et Ochi (6) en ont séparé 3 et Uenaka (7) en reconnaît 5.

II. ACTION ANTI-HÉMOLYTIQUE DES SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES. — D'après nos observations, la souche Letivi ensemencée dans du bouillon Vf non glucosé permet d'obtenir des toxines histolytiques contenant, par centimètre cube, 100 à 300 D. M. (souris, veines) et 250 à 500 doses hémolytiques (8) ; l'activité hémolytique de ces préparations disparaît rapidement au cours de la conservation (9).

Avec la souche danoise de *Cl. histolyticum*, nous avons obtenu des toxines contenant, par centimètre cube, 150 à 300 D. M. et 125 doses hémolytiques. Les propriétés hémolytiques de ces toxines sont aussi instables, pendant le vieillissement, que celles des toxines préparées dans les mêmes conditions avec la souche Letivi ; aussitôt après leur préparation, leur effet hémotoxique est neutralisé par les immunosérums homologues, par les sérums anti-Letivi et même par les sérums anti-vibron septique employés à faible dose. Réciproquement, l'action hémolytique de la toxine vibron septique est supprimée par de faibles doses de sérum anti-histolytique. Aussi supposons-nous que les sérums

(4) MURIEL ROBERTSON, *J. Path. a. Bact.*, 1919, **23**, 153.

(5) J. DAVESNE, *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 763.

(6) T. KONNO et Y. OCHI, *J. jap. Soc. Veter. Sci.*, 1929, **8**, 145.

(7) S. UENAKA, *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1938, **93**, 236. D'après cet auteur, l'antitoxine provenant des animaux respectivement immunisés avec la toxine engendrée par 5 races sérologiques différentes de *Cl. septicum*, neutralise aussi bien la toxine de la race homologue que celle des races hétérologues.

(8) MAYLIS GUILLAUMIE, ces *Annales*, 1941, **67**, 389.

(9) MAYLIS GUILLAUMIE, ces *Annales*, 1942, **68**, 84.

anti-histolytiques et anti-vibron septique possèdent des anti-hémolysines comparables.

III. TITRE AGGLUTINANT DES SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES. — *Sérums employés* : Sérums de chevaux immunisés avec les antigènes du *Cl. histolyticum* (souches Letivi et danoise) ; sérums de lapins préparés par des injections intraveineuses d'une suspension de *Cl. histolyticum* chauffée à 60°, faite avec les microbes des cultures obtenues en ensemençant des bouillons Vf avec la souche histolytique danoise.

Résultats : en quatre heures à 37° les sérums anti-histolytiques des animaux immunisés contre la souche danoise de *Cl. histolyticum* agglutinent en général fortement les deux souches de *Cl. histolyticum* que nous avons étudiées et rarement le *Cl. septicum* ; les sérums anti-Letivi n'agglutinent fortement que la souche Letivi. Les résultats notés le lendemain montrent que les 2 souches de *Cl. histolyticum* sont agglutinées par de faibles doses de tous les sérums, cependant le titre agglutinant vis-à-vis de la souche de *Cl. histolyticum* qui a servi à l'immunisation est plus élevé que vis-à-vis de la 2^e souche histolytique employée dans nos recherches ; quelquefois la souche Feunten est agglutinée, mais uniquement par des doses élevées de sérum. Ces doses sont telles, que le pouvoir agglutinant des sérums anti-histolytiques que nous avons titrés jusqu'à présent vis-à-vis de la souche Feunten se montre comparable, sauf dans un cas (sérum 601 a), à celui des sérums normaux. Exemple : avant toute immunisation, le sérum du lapin 322 titre 100 en présence de la souche danoise de *Cl. histolyticum* et moins de 10 vis-à-vis du *Cl. septicum* (Feunten) ; après 3 inoculations de *Cl. histolyticum* danois, il titre 25.000 vis-à-vis de la souche histolytique danoise, 5.000 vis-à-vis de la souche Letivi et encore moins de 10 vis-à-vis de la souche Feunten ; après 5 inoculations, le titre agglutinant anti-Feunten est toujours inférieur à 10 (lectures de vingt-quatre heures). Après une inoculation d'antigène histolytique préparé avec la souche danoise, le titre agglutinant du sérum du cheval 601 est de 2.500 vis-à-vis de la souche homologue et de 100 vis-à-vis de la souche vibron septique Feunten. Après 10 inoculations le sérum 601 a de ce cheval titre 50.000 vis-à-vis de la souche histolytique danoise et 250 vis-à-vis de la souche Feunten. Le titre agglutinant anti-Feunten a donc subi une très légère augmentation ; cette augmentation a été fugace puisque le sérum de la saignée suivante, faite un mois plus tard, présentait le titre initial de 100 vis-à-vis de la souche Feunten alors que le titre vis-à-vis du *Cl. histolyticum* danois était encore de 50.000. Quant au pouvoir agglutinant du sérum 600 b vis-à-vis de la souche Feunten, il n'est pas plus élevé que celui d'un sérum normal. Nous nous proposons de rechercher si les inoculations régulières d'antigène histolytique, effectuées pendant un temps suffisant, feront apparaître à la longue chez les chevaux des variations importantes du pouvoir agglutinant de leur sérum vis-à-vis du *Cl. septicum*.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION. — Le sérum de différents chevaux immunisés contre les antigènes de diverses souches de *Cl. histolyticum* neutralise les toxines préparées avec 2 souches de *Cl. septicum*.

Les toxines histolytique et vibron septique doivent avoir des antigènes communs mais à des taux extrêmement inégaux.

NUTRITION CARBONÉE DES FIXATEURS D'AZOTE ET SYMBIOSE BACTÉRIENNE

par J. POCHON et Y. T. TCHAN.

Le problème de la nutrition carbonée des fixateurs d'azote au cours des processus biologiques anaérobies du sol est relativement simple. Si *Clotridium pasteurianum* est incapable d'utiliser la cellulose comme aliment énergétique, il peut cependant hydrolyser les polysides moins complexes (du type des hémicelluloses). De plus sa symbiose possible avec les bactéries cellulolytiques du type Oméliansky a été depuis longtemps mise en évidence [Pringsheim-Koch] (1).

Mais dans les conditions écologiques normales, sous les climats tempérés, de tels processus, entre fixateurs anaérobies et cellulolytiques anaérobies ne peuvent être fréquents [Pochon et Tchan (2)]. Le rôle principal, dans la fixation de l'azote, revient certainement aux *Azotobacter*. Mais ici le problème de leur nutrition carbonée est beaucoup plus complexe.

Un certain nombre d'auteurs pensent que les *Azotobacter* peuvent utiliser les acides fixes et volatiles, les alcools, produits au cours de la fermentation des hydrates de carbone du sol par les germes banaux. Nous avons antérieurement montré qu'il fallait éliminer de ces corps les acides acétique et butyrique qui semblent inutilisables dans le sol et avons par contre mis en évidence l'intérêt de l'acide pyruvique. Mais il faut avouer que cette hypothèse, qui implique la simultanéité ou la succession d'un processus anaérobie (fermentation) et aérobie (fixation) n'est pas entièrement satisfaisante.

Aussi d'autres auteurs pensent-ils qu'il faut envisager une symbiose des *Azotobacter* avec les micro-organismes cellulolytiques aérobies. Les premiers essais de Pringsheim et de Winogradsky avaient été négatifs. Makrinoff (3) avait d'abord constaté l'ébauche du phénomène sur la tourbe mais n'avait pu le vérifier au laboratoire ; puis il avait montré que lors de la fermentation de la paille par les bactéries cellulolytiques, il y avait en même temps gain en azote et pullulation des *Azotobacter*. Vandecaveye et Villanueva (4), en enrichissant avec du papier de la terre fumée ou non fumée, avaient constaté, d'une part, l'augmentation des *Azotobacter* et des bactéries cellulolytiques aérobies, d'autre part, après un délai de quatre-vingts à cent cinquante jours, un gain en azote, surtout sous forme de nitrates.

Nous avons repris cette étude dans les conditions suivantes : nous avons réalisé des couches minces, en boîte de Pétri, de terre pauvre en azote (0,5 p. 1.000), enrichie en cellulose (1 p. 100 de papier filtre, type Durieux sans cendre III). Après un certain temps de séjour à l'étuve à 30°, nous avons, parfois, constaté la présence de colonies d'*Azotobacter*

(1) PRINGSHEIM, *Zentralbl. Bakt.*, II, 1909, 23, 300 ; KOCH, *Ibid.*, II, 1910, 27, 1.

(2) POCHON et TCHAN, *ces Annales* (sous presse).

(3) MAKRINOFF, *Zentralbl. Bakt.*, II, 1934, 40, 154 ; 1935, 42, 31.

(4) VANDECAVEYE et VILLANUEVA, *Soil. Sc.*, 1934, 38, 191.

en surface et, toujours, par l'examen microscopique direct, une augmentation très nette des *Azotobacter* par rapport à une terre témoin, traitée de la même façon, mais sans addition de cellulose. Le rapport était en moyenne de 4 à 1. Enfin le dosage de l'azote total (méthode de Kjeldahl) a mis en évidence une augmentation du taux de celui-ci : après un séjour de vingt-huit jours à l'étuve, le taux d'azote était passé à 1,5 p. 1.000 dans le témoin et à 2,25 p. 1.000 dans la terre enrichie en cellulose. Il est à noter que l'augmentation du taux dans la terre témoin correspond à la fixation banale d'une terre aérée qui contient toujours assez de carbone pour assurer une certaine pullulation des *Azotobacter*. Notre expérience montre une amélioration très nette du taux de fixation par enrichissement en cellulose.

Le délai relativement long nécessaire pour que le phénomène soit net explique les résultats de Winogradsky qui avait lu ses expériences après un délai de deux jours seulement. Les nôtres sont cependant beaucoup moins prolongées que celles de Vandecaveye et Villanueva, ce qui diminue les difficultés d'interprétation et, en particulier, élimine la possibilité de processus biologiques successifs nombreux intermédiaires entre la cellulolyse et la fixation. De fait, l'examen microscopique direct ne nous a montré qu'une flore peu variée : au milieu de fibres en voie de cellulolyse et couvertes de B. cellulolytiques, des amas de cellules d'*Azotobacter*, véritables colonies, telles que Winogradsky les a décrites dans le sol.

Cela n'est cependant pas suffisant et il restait à apporter la démonstration de la symbiose *directe* entre *Azotobacter* et cellulolytiques aérobies. Dans ce but, nous avons ensemencé des plaques au silico-gel à la cellulose (feuille de papier filtre) avec une culture pure (au sens de Winogradsky) de *Cytophaga* ; lorsque la feuille de papier a été entièrement recouverte de la gelée mucilagineuse classique de *Cytophaga*, après vingt jours de séjour à l'étuve, nous avons pratiqué des examens microscopiques qui nous ont montré, au milieu de la gelée bourrée de coccoides, des colonies microscopiques typiques d'*Azotobacter*. Nous précisons qu'il ne s'agit pas de cellules isolées, que l'on pourrait croire sous leur forme quiescente et simplement transportées lors de l'ensemencement, mais bien de groupes de cellules, sous leur forme végétative, de colonies, en pleine prolifération, loin de l'ensemencement. Dans un tel milieu, les seuls corps carbonés, en dehors des restes de cellulose inattaquée, que nous savons inutilisables pour les *Azotobacter*, sont les produits de transformation de cette cellulose par les *Cytophaga*, soit produits extracellulaires, soit produits intracellulaires libérés lors de l'autolyse.

Ainsi est mise en évidence de façon définitive, la symbiose directe entre *Azotobacter* et bactéries cellulolytiques aérobies, sans autres bactéries associées, sans autre cycle intermédiaire.

Nous ne discuterons pas ici du mécanisme intime de cette symbiose ni de la succession des processus chimiques qui peuvent y être impliqués. Disons seulement qu'ils sont certainement d'un tout autre ordre que ceux évoqués par les partisans de l'utilisation des acides et des alcools, puisque ceux-ci sont absents du métabolisme des cellulolytiques aérobies qui transforment la cellulose en oxycellulose.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

**LA BENZOATASE DES AZOTOBACTER.
L'ACIDE SALICYLIQUE, TERME INTERMÉDIAIRE
DE L'OXYDATION DE L'ACIDE BENZOÏQUE**

par TCHAN YAO-TSENG.

L'oxydation de l'acide benzoïque par les *Azotobacter*, a été mise en évidence par Winogradsky (1) ; Reuszer (2) a étudié le rôle de cet acide dans leur nutrition carbonée au sein du sol. Nous avons antérieurement montré (3) que le terme final de l'oxydation de l'acide benzoïque est un « corps noir » apparenté à l'humus du sol.

L'aspect des cultures nous a fait penser à un processus enzymatique. En effet, la diffusion de la couleur noire, sur plaque de silico-gel benzoaté, n'a rien de commun avec celle d'un colorant ; elle y apparaît avant même que soient visibles les colonies d'*Azotobacter* ; il ne peut donc s'agir de la diffusion d'un pigment. Par ailleurs, elle n'a rien de commun non plus avec le pigment brun qui apparaît dans toutes les cultures âgées d'*Azotobacter* et qui ne diffuse pas.

Pour vérifier cette hypothèse d'un phénomène enzymatique, nous avons réalisé les expériences suivantes :

I. — Une culture d'une semaine en milieu liquide est filtrée d'abord sur papier puis sur bougie L 3. Le filtrat, est légèrement coloré. On le divise en 2 portions. Une conservée à la glacière, l'autre à l'étuve à 30°. Après quarante-huit heures, on constate une différence de teinte très nette.

II. — 3 boîtes de silico-gel benzoaté de 10 cm. de diamètre sontensemencées avec une culture d'*Azotobacter*. Après trois jours, on récolte les cellules. On les émulsionne dans 100 cm³ d'une solution de Winogradsky benzoatée à 4 p. 1.000. On divise l'émulsion en 4 parties de 25 cm³. Dans les 2 premières, on ajoute 0,25 cm³ de toluène. On conserve :

1° Toluène à 1 p. 100 à 30°.

2° Toluène à 1 p. 100 à 0°.

3° Sans toluène à 30°.

4° Sans toluène à 0°.

On agite les flacons deux fois par jour. Après dix jours, on compare la teinte.

Dans le numéro 1 : teinte brune.

Dans le numéro 2 : sans changement ou très peu.

Dans le numéro 3 : noir foncé.

Dans le numéro 4 : à peine colorée.

(1) S. WINOGRADSKY, ces *Annales*, 1932, 48, 89.

(2) H. W. BENZER, *Soil. Sc. Vol. A*, 1935, 151.

(3) Y. T. TCHAN, ces *Annales*, 1946, 72, 699.

III. — On prépare 4 fioles contenant 50 cm³ de milieu de Winogradsky benzoaté à 4 p. 1.000. On les ensemence avec une culture d'*Azotobacter*, et on les porte à l'étuve à 35°.

Après quarante-huit heures.

1 fiole est mise à la glacière.

1 fiole est laissée à l'étuve telle quelle.

2 fioles sont additionnées de chloroforme (déposé dans un petit tube suspendu au-dessus de la culture) et remises à l'étuve.

Vingt-quatre heures plus tard, on constate que les deux fioles chloroformées sont devenues brun foncé, que la fiole sans chloroforme et la fiole mise à la glacière, n'ont pas changé de couleur.

Ces expériences démontrent bien la nature enzymatique du phénomène. Il s'agit d'enzymes qui diffusent hors de la cellule bactérienne et qui, soit dit en passant, n'ont rien de commun avec une tyrosinase, car nos souches d'*Azotobacter* ne noircissent pas la tyrosine et sont même incapables de l'utiliser comme aliment.

Nous avons cherché à préciser le mécanisme de cette action enzymatique. La théorie indique que le premier terme doit être une oxydation capable de libérer l'énergie nécessaire à la synthèse des constituants des bactéries (une décarboxylation antérieure à l'oxydation conduirait d'ailleurs au benzène, inutilisable par les *Azotobacter*). Cette oxydation doit amener la formation d'un acide-phénol, l'acide salicylique par exemple, et l'on sait par ailleurs que cet acide est un aliment énergétique pour les *Azotobacter* (4).

— Nous avons donc cherché, pour vérifier cette hypothèse, la présence de l'acide salicylique dans les cultures ; recherche difficile car il s'agit d'un corps intermédiaire qui ne s'accumule pas dans le milieu. Nous avons procédé ainsi :

200 cm³ d'une vieille culture pure, âgée de dix jours au moins, sont acidifiés par SO₂H₂ dilué (5 p. 100). On constate un changement de coloration qui vire au brun rose sale. On ajoute encore quelques gouttes d'acide après le virage. On laisse dix-huit heures à l'étuve à 30°. On filtre sur papier. Le filtrat est épuisé par le benzène. On sépare le benzène par décantation. On ajoute 1 cm³ d'eau distillée dans le benzène et 1 goutte de Cl₃Fe à 10 p. 100. Une coloration violette ne tarde pas à apparaître dans la phase aqueuse. En évaporant le benzène avant l'addition de l'eau et de Cl₃Fe, on obtient une poudre cristalline peu soluble dans l'eau froide, soluble dans l'eau bouillante, donnant une coloration rouge avec le NO₂Na en présence de SO₄Cu et de CH₃COOH au bain-marie (5).

Ces résultats, nous permettent d'affirmer la sécrétion par les *Azotobacter*, d'exoenzymes capables d'oxyder l'acide benzoïque en un corps analogue à l'humus. Sous l'influence d'une oxydase (que l'on pourrait appeler benzoatase) se forme de l'acide salicylique qui apparaît comme un terme intermédiaire de cette oxydation.

(Institut Pasteur, annexe de Garches. Laboratoire de M. POCHON.)

(4) GUITTONNEAU et CHEVALIER, *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **203**, 211 et 1400.

(5) DENIGÈS, CHELLE et LABAT, *Précis de Chimie analytique*, 1931, **2**, 248 ; *Id.*, 1931, **4**, 240.

CULTURES DE TISSUS APPLIQUÉES A LA SOLUTION DE PROBLÈMES IMMUNOLOGIQUES

II. — ÉTUDE D'UN SÉRUM ANTILEUCOCYTAIRE MÉCANISME DE SON ACTION *IN VITRO* CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES ANAPHYLACTIQUES EN CULTURES DE TISSUS

par E. LASFARGUES et A. DELAUNAY.

INTRODUCTION. — L'un de nous a montré dans une communication précédente (1) que lorsqu'on injecte, dans l'organisme du cobaye, un sérum de lapin antileucocytes de cobaye, on déclenche chez cet animal des désordres graves qui résultent bien davantage des conséquences d'une interaction d'ordre anaphylactique entre les anticorps apportés par l'immunsérum et les antigènes correspondants, que d'une destruction lytique, massive, des globules blancs. Nous avons étudié l'action du même sérum antileucocytaire en cultures de tissus ; nous présentons dans ce travail les résultats que nous avons obtenus.

PARTIE EXPÉRIMENTALE. — *Technique.* Toutes nos expériences ont été réalisées par la méthode de Carrel en gouttes pendantes. Le tissu choisi fut la rate du cobaye adulte, pour deux raisons principales, d'une part, parce que cet organe est riche en globules blancs, d'autre part, parce qu'il compte parmi ceux renfermant le plus d'antigène de Forssman.

Le sérum antileucocytaire fut étudié parallèlement au cours de deux séries d'expériences portant, l'une sur des fragments de rate de 1 mm. environ, fraîchement prélevés (cultures au départ), l'autre sur des cultures constituées essentiellement par des macrophages. Celles-ci provenaient de tissus spléniques (cobaye) après plusieurs passages.

Le milieu de chaque culture était composé par II gouttes de plasma de cobaye et II gouttes de sucs nutritifs (jus de rate) auxquelles on ajoutait I goutte de sérum antileucocytaire pour les cultures en expérience ou I goutte de Ringer pour les cultures témoins.

Le sérum antileucocytaire que nous avons utilisé était un sérum décomplémenté par vieillissement. Introduit dans les cultures, il se trouvait dilué au 1/5 et par conséquent encore très actif, puisque la méthode de titrage exposée par nous avait montré que son activité restait sensible au 1/20.

RÉSULTATS. — a) *Action du sérum antileucocytaire sur des cultures de rate au départ (polynucléaires).*

Vingt-quatre heures après la mise en culture normale d'un fragment de tissu splénique fraîchement prélevé, on observe une migration abondante de cellules mobiles qui envahissent le milieu, formant macroscopiquement un halo blanchâtre autour des explants. Ces cel-

(1) A. DELAUNAY, J. PAGES et M. MAURIN. Cette communication paraîtra en Mémoire dans un prochain numéro des *Annales*.

lules sont, pour la plus grande partie, des polynucléaires auxquels se joignent quelques cellules mononucléées (2). Nous retrouvons exactement le même tableau dans les cultures témoins où le milieu a été additionné d'une goutte de Ringer.

Au contraire, dans les cultures ayant reçu une goutte de sérum antileucocytaire, l'aspect est tout autre : la migration se trouve considérablement réduite avec des éléments pour la plupart altérés, arrondis, granuleux, en état de souffrance évidente.

Cette expérience, reprise un certain nombre de fois, a toujours donné des résultats concordants.

Repiquage. — Repiqués en milieu normal, exempt de sérum antileucocytaire, les fragments de rate ont présenté une croissance retardée et très médiocre ; apparition de quelques macrophages et de rares fibroblastes.

Action du complément. — Ainsi donc, dans nos expériences, nous pouvions noter une altération manifeste des globules blancs qui, selon toute vraisemblance, résultait de l'action combinée des anticorps antileucocytaires apportés par l'immunsérum et des traces de complément que renfermait le plasma du milieu de culture. Lorsqu'on ajoute à ce milieu une plus grande quantité de complément (sérum frais de cobaye) l'altération cellulaire n'est pas plus marquée. On relève au contraire une amélioration fugace de l'état des cultures et une migration cellulaire plus abondante. Devait-on incriminer dans ce cas la dilution plus grande de l'antisérum ou une action excitante du sérum frais sur la sortie cellulaire ? Il est probable que ces deux causes ont dû jouer.

b) *Action du sérum antileucocytaire sur des souches de tissu splénique* (macrophages). — Parmi les leucocytes injectés au lapin pour obtenir le sérum antileucocytaire en cause, il y avait 80 p. 100 de polynucléaires et 20 p. 100 d'éléments mononucléés, probablement de nature macrophagique. On pouvait donc penser que ce sérum serait également antimacrophages. Pour nous en assurer, la méthode de culture des tissus était la méthode de choix, le test physiologique décrit dans la communication précitée n'étant pas applicable aux macrophages, qui, dans les conditions normales, ne présentent que peu de tendances à se déplacer vers les grains d'amidon.

Des expériences en tous points comparables aux premières ont été faites sur des cultures de tissu splénique après plusieurs passages. La grande majorité des cellules en voie de multiplication est alors représentée par des macrophages.

Après vingt-quatre heures, le nombre des macrophages dans les cultures ayant reçu du sérum antileucocytaire est plus réduit que dans les témoins mis en présence de Ringer.

Dans les quarante-huit heures qui suivent, alors que les témoins se développent normalement, les macrophages en expérience sont de plus en plus altérés, globuleux, bourrés de granulations grasses et fortement chargés de pigment.

Repiquage. — Les cultures ayant subi l'action du sérum antileuco-

(2) Il ne s'agit pas d'une véritable culture de polynucléaires et de mononucléaires, mais d'une simple migration dans le milieu ambiant de cellules en survie.

cytaire sont repiquées pour une part en milieu normal et pour une autre part en milieu additionné de sérum anti-.

En milieu normal, les macrophages recouvrent peu à peu leurs caractères habituels tandis que la continuité de l'action du sérum antileucocytaire aggrave leurs altérations. Celles-ci s'accroissent au cours de nouveaux passages jusqu'à la mort des cellules.

Action du complément. — Comme précédemment et dans les mêmes conditions nous avons recherché les modifications apportées à nos cultures par l'addition du sérum frais (complément) au sérum antileucocytaire.

Ici encore, nous avons observé une action favorisante, caractérisée cette fois par l'accélération de la multiplication des macrophages et un meilleur état de ces cellules. Ces faits deviennent particulièrement nets au cours des repiquages. La dégénérescence cellulaire se poursuit sans doute mais de façon beaucoup moins rapide que dans les cultures témoins. Les raisons de cette amélioration sont probablement les mêmes que celles invoquées plus haut : dilution plus grande de l'anti-sérum, action excitante du sérum frais sur la pousse cellulaire.

1° Nous pouvions conclure de ces deux séries d'expériences qu'un sérum renfermant des anticorps antileucocytaires (anticorps spécifiquement antileucocytaires et anticorps de Forssman), ajouté à des cultures « *in vitro* » exerce une action toxique à la fois sur les polynucléaires et sur les macrophages. Nous avons recherché le mécanisme intime de cette action toxique : s'agissait-il d'une pure action lytique semblable à une hémolyse par un sérum spécifique, ou bien d'une réaction particulière de type anaphylactique résultant de la combinaison entre les anticorps contenus dans l'immunsérum et les antigènes leucocytaires correspondants. On sait qu'*in vivo*, dans la peau du lapin ou du cobaye par exemple, la combinaison entre antigène et anticorps spécifiques conduit à une nécrose. C'est le phénomène classique d'Arthus. Etions-nous en présence d'un phénomène d'Arthus *in vitro* ?

Il était facile dans notre cas de savoir si nous trouvions en présence d'une véritable réaction anaphylactique. Il suffisait d'ajouter à nos cultures de rate de cobaye (départs ou souches) un sérum qui n'était pas spécifiquement antileucocytaire, mais qui, renfermant un anticorps de Forssman, pouvait néanmoins se fixer sur les leucocytes qui sont riches en antigène de Forssman. Nous avons cherché si cette fixation sur des tissus cultivés *in vitro* s'accompagnait de nécrose. Nos cultures ont été additionnées d'une goutte de sérum de lapin anti-globules rouges de mouton riche en anticorps de Forssman. Non seulement elles n'ont pas souffert, mais elles ont mieux poussé que les témoins additionnés d'une goutte de Ringer. Cette amélioration est due à une action excitante, banale, du sérum. On peut ainsi exclure l'hypothèse, pour expliquer l'altération des cellules par le sérum antileucocytaire, d'une réaction anaphylactique.

Par ailleurs, nous avons ajouté aux cultures un sérum antileucocytaire débarrassé de l'anticorps de Forssman par contact prolongé avec des globules rouges de mouton. Nous avons retrouvé cette fois toutes les lésions cellulaires caractéristiques que nous avons décrites plus haut.

Il est donc probable que l'action du sérum antileucocytaire en cultures de tissus se ramène à une action cytotoxique classique, directe.

*
* *

2° Dans l'expérience précédente, alors que nous cherchions à reproduire *in vitro* un phénomène anaphylactique, nous apportions l'anticorps (anticorps de Forssman) au contact de l'antigène correspondant contenu dans les cellules. Il nous a paru intéressant de savoir ce qui se passerait en intervertissant l'ordre des facteurs, en apportant cette fois l'antigène au contact des cellules sensibilisées, c'est-à-dire riches en anticorps. Voici comment nous avons opéré :

Technique. — Des cobayes sont immunisés par 6 à 7 injections sous-cutanées de 1 cm³ de sérum de cheval espacées de trois jours en trois jours jusqu'au moment où une injection intradermique de 0,5 cm³ de sérum provoque la réaction inflammatoire typique qui caractérise le phénomène d'Arthus. Les rates de ces cobayes sont alors prélevées et des fragments de ces organes mis en culture en boîtes de Pétri, les unes en milieu normal, les autres en présence d'une goutte de sérum de cheval. Quelques cultures entretenues en milieu normal fournissent après plusieurs passages les souches de macrophages et de fibroblastes sur lesquelles l'action du sérum de cheval est également essayée.

Résultats. — Nous avons constaté, non pas une nécrose entraînant la mort des tissus, mais au contraire, une action excitante de la part du sérum de cheval, favorisant, d'une part, la migration des polynucléaires dans les cultures au départ, et par ailleurs, une croissance nettement plus active des souches macrophages-fibroblastes. Nous avons retrouvé en un mot, les résultats obtenus en 1933 par Aronson (3) opérant dans des conditions analogues aux nôtres (4).

Ils semblent montrer qu'on ne peut reproduire un phénomène d'Arthus in vitro.

*
* *

3° Faut-il s'étonner de cette conclusion ? Après réflexion, nous ne le pensons pas. Plus nos connaissances progressent, mieux il apparaît que les symptômes qui traduisent une réaction anaphylactique *in vivo* n'extériorisent pas simplement la réaction antigène-anticorps au sein des tissus, mais les conséquences de celle-ci. La réaction antigène-anticorps donnerait naissance à certains produits : anaphylatoxine ? histamine ? acétylcholine ? qui, en diffusant dans l'organisme, finiraient

(3) ARONSON, *J. Immunol.*, 1933, **35**, 1.

(4) En dehors d'ARONSON, SERENI et GAROFOLINI, (*Arch. exp. Zellforsch.*, 1933, **13**, 53) ont abouti à des résultats un peu différents. D'après ces auteurs, du sérum de cheval très dilué, ajouté à des cultures de rate, de moelle osseuse et de mésentère de poulets sensibilisés au sérum de cheval, entraînerait la dégénérescence et la mort des cellules. Cependant, ce phénomène anaphylactique *in vitro* ne pourrait pas être reproduit quand on opère dans les mêmes conditions avec le cœur, le rein, l'estomac et le testicule de poulet.

Parmi les auteurs qui ont étudié également les phénomènes anaphylactiques en cultures de tissus, nous citerons C. LEVADITI, RICH et LEWIS, MEYER et LOWENTHAL, MENDELEEF, BARG, MOEN et SWIFT. Nous reviendrons ultérieurement sur leurs recherches.

par atteindre des cellules sensibles à leur action et provoqueraient ainsi des accidents variés (5). *En cultures de tissus* la combinaison antigène-anticorps pourrait aussi libérer quelque substance mais celle-ci, dans les cas que nous avons examinés, n'aurait pas rencontré de récepteurs sensibles. C'est probablement pour cette raison que les cellules de nos cultures n'ont accusé aucun signe de souffrance.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

VACCIN ANTIRABIQUE PHÉNIQUÉ A BASE DE SUBSTANCES NERVEUSES AUTRES QUE CELLES DU LAPIN. DISPARITION DES INCIDENTS DE CHOC

par J. H. RAYNAL et Y. CH. LIEOU.

Au cours de la vaccination antirabique par le vaccin phéniqué, des incidents de choc ont été observés dans la pratique d'un grand nombre d'Instituts utilisant cette technique pour le traitement préventif de la rage chez l'homme. Nous avons, nous-mêmes, impartialement signalé dans nos rapports annuels, de 1938 à 1944, tous ceux qui étaient survenus dans notre pratique à Chang-Haï. Ces incidents sont quelquefois dramatiques, mais leur gravité est exceptionnelle et nous n'avons eu, quant à nous, aucun cas mortel à déplorer.

Nous avons essayé, il y a quelques années, d'en rechercher la cause. L'expérimentation chez le lapin nous avait même conduits à incriminer l'acide phénique dans le déclenchement de leur apparition(1). En corollaire, nous avions pris l'habitude, au moment de l'injection à nos patients, d'ajouter extemporanément dans la seringue 5 cm³ d'eau physiologique stérile aux 5 cm³ de vaccin phéniqué à 1 p. 100. En fait cette dilution ne nous avait donné qu'une amélioration partielle pendant trois ans, de 1941 à 1944.

Depuis avril 1944, soit depuis près de deux ans, une constatation très intéressante s'impose. *Les incidents de choc* ont entièrement disparu des statistiques du département antirabique de l'Institut Pasteur de Chang-Haï. Or, auparavant, les émulsions de substance nerveuse phéniquée servant aux traitements provenaient de lapins et, en raison de l'extrême pénurie de ces animaux, nos vaccins antirabiques phéniqués furent préparés, à partir d'avril 1944, avec des cerveaux de moutons ou des cerveaux de chiens. *Cette substitution dans la substance cérébrale utilisée est l'unique facteur que nous puissions invoquer pour expliquer la disparition radicale des incidents de choc au cours de nos traitements.*

(5) Contractions des muscles bronchiques dans le choc anaphylactique aigu. Atteinte des cellules endothéliales au cours du phénomène d'Arthus, etc...

(1) J. H. RAYNAL et Y. CH. LIEOU, *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 242.

	1937 A 1940		1941 A AVRIL 1944		1944 A 1946	
	Nombre	p. 100	Nombre	p. 100	Nombre	p. 100
Traitements	920		1.259		821	
Syncope	11	1,19	8	0,63	0	0
Syncope + légers incidents.	24	2,6	25	1,98	0	0

1937 à 1940 : De juillet 1937 à décembre 1940, période pendant laquelle le vaccin *cerveau de lapin* a été injecté tel quel.
 1941 à 1944 : De décembre 1940 à avril 1944, le vaccin *cerveau de lapin* a été dilué au moment de l'emploi.
 1944 à 1946 : D'avril 1944 à janvier 1946, le vaccin *cerveau de mouton* (ou *cerveau de chien*) a été substitué au *cerveau de lapin*.

En vérité, exposant les résultats d'une enquête menée il y a quelques années par l'Institut Pasteur d'Alger, Béguet et Horrenberger avouent que « de nombreux Instituts qui ont pratiqué un très grand nombre de vaccinations avec les vaccins phéniqués (14 Instituts, 140.000 traités) déclarent qu'ils n'ont rien constaté d'anormal » (2). Il est probable et il serait facile de vérifier qu'il s'agit bien là d'Instituts n'utilisant pas le cerveau de lapin. Lors d'une mission aux Indes Anglaises, en 1933, nous pouvions nous convaincre que l'Institut antirabique de Schillong en Assam, se servant de cerveaux de moutons, n'avait pas d'ennuis au cours de ses traitements phéniqués.

Nous n'essayerons pas, pour le moment, d'expliquer la raison de cette différence de comportement entre les émulsions cérébrales phéniquées de lapins et celles de moutons ou de chiens. Cela nécessiterait l'exposé de nombreuses hypothèses dans le détail desquelles il serait prématuré de nous engager.

Conclusion. — Pour éviter les incidents signalés au cours du traitement préventif de la rage par les vaccins phéniqués, il convient de ne pas utiliser le cerveau du lapin dans la préparation du vaccin antirabique. On pourra avec avantage s'adresser au chien, de préférence au mouton dont la substance nerveuse virulente constitue d'ailleurs un meilleur antigène que celle des autres animaux.

(Institut Pasteur de Chang-Haï.)

SUR LA DÉCOMPOSITION DE L'EAU OXYGÉNÉE PAR LE BACILLE DE KOCH

par E. ANDREJEW.

L'eau oxygénée, même à des concentrations extrêmement faibles, exerce une action inhibitrice ou bactéricide sur un grand nombre de bactéries. Par exemple d'après un travail récent de A. Lwoff et

(2) M. BÉGUET et R. HORRENBARGER, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1940, 33, 230.

M. Morel (1), l'eau oxygénée dont la concentration varie de 1 p. 4.000.000 à 1 p. 400.000 exerce en milieu synthétique une action inhibitrice sur *Proteus vulgaris* et aux concentrations supérieures à 1 p. 400.000 une action bactéricide nette. *B. subtilis*, aérobie strict, ainsi que *E. coli*, aérobie facultatif, d'après ces auteurs, se comportent comme *Proteus vulgaris*. Nous avons constaté que le développement du bacille de Koch en milieu synthétique de Long n'est pas entravé par l'adjonction de 4 p. 100 d'eau oxygénée, tandis qu'à des concentrations inférieures à 2 p. 100 l'eau oxygénée semble même favoriser légèrement la culture et qu'à des concentrations supérieures à 4 p. 100 elle inhibe la végétation. Afin d'écarter toute cause d'erreur due aux variations du pH, l'eau oxygénée employée fut neutralisée à la soude N/10 au moment de l'emploi. Son titre (10 volumes) a été également établi extemporanément par des dosages manganométriques.

Etant donné que l'action inhibitrice de l'eau oxygénée varie en fonction du milieu où elle s'exerce et que ces variations sont d'autant plus sensibles que le milieu est plus riche en éléments susceptibles de réagir avec elle, nous avons tout d'abord cherché à écarter la cause d'erreur due au milieu de Long même. Une série de dosages nous a démontré que ce milieu, malgré les traces de fer qu'il contient, ne réagit qu'avec des quantités insignifiantes d'eau oxygénée.

D'autre part, la stabilité de l'eau oxygénée variant selon le degré de dilution, nous avons employé une même concentration qui est de 14 parties d'eau oxygénée à 10 volumes complétées à 100 avec du milieu de Long.

Après vingt-quatre heures d'étuve à 38° nous avons trouvé pour le milieu de Long non additionné de bacilles, une décomposition de l'eau oxygénée de l'ordre de 2 p. 100 et, après quarante-huit heures, de 12 p. 100.

Par contre, le même milieu de Long additionné de la même quantité d'eau oxygénée et introduit sous le voile d'une culture du bacille tuberculeux humain, âgée de trois semaines, s'est comporté d'une façon très différente. C'est ainsi qu'après vingt-quatre heures d'étuve à 38°, nous avons trouvé 77,1 p. 100 d'eau oxygénée décomposée, et, après quarante-huit heures, plus de 99 p. 100.

Cette expérience nous permet de conclure d'une part que l'eau oxygénée ne réagit que d'une façon insignifiante avec le milieu de Long pur et que par conséquent son potentiel dans ce milieu offre une certaine stabilité, tout au moins dans les conditions de nos expériences ; d'autre part, qu'en présence de bacilles de Koch, toutes conditions égales d'ailleurs, la décomposition de l'eau oxygénée devient très énergique.

Le bacille de Koch est par conséquent responsable de cette destruction. Afin de préciser ce point nous avons pesé les bacilles secs. Il en résulte que 0,608 g. de bacilles d'une culture en voile âgée de trois semaines décomposent en milieu de Long 0,177 g. d'eau oxygénée pure sur 0,2225 présents, en libérant ainsi 58 cm³ d'oxygène en vingt-quatre heures et à 38°.

Pour savoir si ce phénomène est dû à la composition purement chimique du bacille ou à sa nature diastasique ou aux deux à la fois,

(1) Ces Annales, 1942, 68, 255.

nous avons réalisé quelques expériences, d'une part sur des bacilles vivants, et d'autre part sur les mêmes bacilles tués par la chaleur.

Les bacilles morts n'ont provoqué aucune destruction dosable de l'eau oxygénée après vingt-quatre heures à 38°.

Il apparaît donc que la décomposition de l'eau oxygénée est due principalement aux diastases du bacille tuberculeux.

Cependant nos recherches des peroxydases et oxydases au moyen de la teinture de gaïac se sont révélées négatives. En quoi nous confirmons les travaux de Goris (2).

La catalase isolée par Halm (3) et E. Long (4) est donc vraisemblablement à la base de ce phénomène.

D'autre part, en raison de cette rapide décomposition de l'eau oxygénée par le bacille de Koch, nous avons essayé de remédier à l'abaissement du potentiel par adjonction quotidienne d'une quantité donnée d'eau oxygénée et d'étudier ainsi l'influence de cet artifice sur la végétation bacillaire.

En ajoutant de l'eau oxygénée au milieu de Long, fraîchement ensemené, pendant sept jours de suite à raison de 1 p. 100 par jour (taux global de 7 p. 100) nous avons constaté que la semence se développe régulièrement et que ce développement est au moins aussi rapide et aussi abondant que celui du témoin.

Par contre, l'adjonction de 2 p. 100 d'eau oxygénée (taux global de 14 p. 100), dans les mêmes conditions, s'est révélée bactériostatique.

Par ailleurs, le milieu de Long souillé par les microbes de la peau ou de la bouche, que nous avons additionné de 1 p. 100 d'eau oxygénée et ensemené ensuite avec des bacilles tuberculeux en voile, s'est révélé bactéricide pour tous les germes de la flore associée, tout en favorisant légèrement le développement du bacille de Koch.

Cette différence entre la résistance des germes banaux et celle du bacille de Koch à l'eau oxygénée peut être mise à profit pour l'isolement des bacilles tuberculeux à partir des produits pathologiques d'origine tuberculeux souillés par une flore secondaire.

(Institut Pasteur.)

ÉTUDE DE LA PRÉCISION DES MÉTHODES DE TITRAGE DE LA PENICILLINE

par JACQUES LESSIAU.

Nous allons montrer par l'étude de séries de titrages de pénicilline que la précision des résultats est très faible et dépend dans une large mesure de l'opérateur et de la technique utilisée.

MÉTHODES EMPLOYÉES. — La méthode « Oxford » est une méthode par dilution. Elle consiste à déterminer à quelle concentration une solu-

(2) *Ces Annales*, 1920, **24**, 497.

(3) *Münch. med. Wochenschr.*, 1897, **44**, 1344.

(4) *Am. Rev. Tub.*, 1919, **3**, 86.

tion de pénicilline empêche le staphylocoque doré de pousser. Pour l'utiliser, on introduit des quantités différentes de pénicilline dans une série de tubes à essais contenant du bouillon ensemencé de staphylocoques. Les lectures se font environ dix-huit heures après cette opération.

La méthode de Heatley est une méthode par diffusion. Elle consiste à mesurer le diamètre d'une circonférence à l'intérieur de laquelle la pénicilline inhibe la croissance du staphylocoque.

La méthode de Bureau ressemble beaucoup à la méthode Oxford. La différence réside en ce qu'elle est appropriée aux micro-dosages d'une part, et en ce que la lecture des résultats, d'autre part, se fait de façon plus précise par le virage d'un indicateur coloré introduit dans le sérum (1).

A. INFLUENCE DE L'OPÉRATEUR. — a) 9 échantillons d'un même liquide sont donnés à titrer par la méthode « Oxford ». Une personne X titre

TABLEAU I.

	UNITÉS	X	Y	Z
X	1	50		
	2	40	20	
	3	40		26
	4	40	20	26
	5	40		
	6	40		
Y	7	20	26	
	8	20		
	9	26	26	

TABL

NUMÉRO	4 ^e JOUR			5 ^e JOUR	6 ^e JOUR	7 ^e JOUR		
	Ox.		H.	Ox.	Ox.	Ox.		H.
	X	Y	X	X	X	X	Y	X
I	1	0,4	0,4		0,4	4	4	
	2	0,4	1,6		0,4	4	4	
	3	0,4			4	16	8	
	4	0,4		1,5	0,4	8	4	6,5
II	5	8	4		8	20	16	
	6	8	8		8	20	8	8
	7	8		10	8	26	16	17
	8	16			8	20	16	

(1) La méthode de Prévot au vert-Janus n'a pas pu être comparée aux autres, la souche de *perfringens* employée ayant subi des mutations brusques qui ont provoqué des irrégularités.

TABLEAU II bis.

NOMBRE D'OPÉRATEURS	RÉSULTAT des titrages	MOYENNE	ÉCARTS MAXIMUM par rapport à la moyenne p. 100
1	4, 4, 16, 8	8	100
Plusieurs opérateurs. .	26, 16, 16, 16, 8, 2	14	85,7
Plusieurs opérateurs. .	8, 4, 8, 8, 2, 2	5,3	62
Plusieurs opérateurs. .	20, 20, 8, 20, 8, 16, 10, 10	14	42,8

utilisant en plus la méthode Sureau. Nous indiquons par « quantité

TABLEAU III.

	QUANTITÉ théorique unités	MÉTHODE Oxford unités	MÉTHODE Sureau unités	MÉTHODE Heatley unités
Première { A . .	40	40		
expérience { B . .	20	30		38
{ C . .	40	60		62
Deuxième { A . .	20	30 40	14	22 25
expérience { B . .	4	6 6	4	4 6

théorique » le nombre d'unités que nous avons placées dans chaque tube.

B. INFLUENCE DE LA MÉTHODE. — La méthode Oxford utilise des gammes discontinues. La gamme employée pour l'expérience faite sur deux milieux synthétiques était la suivante :

0,4, 4, 8, 16, 20, 26, 40, 50 unités.

L'intervalle était grand entre 0,4 et 4 ; nous n'avons tenu compte des résultats inférieurs à 4 que lorsqu'une gamme plus serrée avait été faite.

La méthode Heatley fournit des résultats curieux : voir les tableaux.

On pourrait proposer de construire une gamme de dilutions plus serrées entre 4 et 50 unités, ce que nous avons fait dans les expériences c ; mais avec cette gamme, l'opérateur hésite souvent entre les dilutions $[X^0$ ou $(X + 1)^0$] pour savoir celle à laquelle la pénicilline a ou n'a pas été active.

D'ailleurs, il suffit de voir par les résultats ci-dessus que nous obtenons des erreurs supérieures à celles dues aux dilutions 4 et 16, 16 et 26, 40 et 60.

CONCLUSION. — Nous estimons que les travaux effectués sur *Penicillium notatum* ou la pénicilline, ayant pour base des déductions tirées

des résultats de titrage ne peuvent pas encore être considérés comme acquis si la variation des phénomènes déduits d'un seul titrage n'est pas d'un ordre supérieur à 80 p. 100.

Une méthode chimique plus précise serait souhaitable car elle éviterait de faire pratiquer un nombre considérable de titrages permettant un calcul statistique.

(Institut Pasteur, Service du Professeur MACHEBOEUF.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Etude d'un sérum antileucocytaire. Mise au point d'une nouvelle méthode de titrage. Mécanisme de son action *in vivo*. Nouvelles observations sur l'inhibition de la diapédèse, par A. DELAUNAY, J. PAGES et M. MAURIN.

Le CO₂, métabolite essentiel ; son rôle dans la cellule bactérienne, par A. LWOFF et J. MONOD.

Séance du 4 avril 1946.

Présidence de M. NÈGRE.

NÉCROLOGIE

MARCEL LISBONNE

Depuis notre dernière réunion nous avons appris avec une vive peine la mort de notre collègue, le docteur Marcel Lisbonne, Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine de Montpellier et directeur du service bactériologique de l'Institut Bouisson-Bertrand. Il était uni par trop de liens à notre Maison et à notre Société pour que je le laisse disparaître sans lui adresser un dernier adieu et sans rappeler ce que notre Association lui doit.

A la fin de ses études médicales effectuées dans sa ville natale de Montpellier, Lisbonne s'était orienté vers la physiologie pour l'enseignement de laquelle il avait acquis le titre d'agrégé. Un stage de deux années à l'Institut Pasteur dans le service du Professeur Delezenne lui avait permis, tout en poursuivant des recherches sur la physiologie, d'approfondir ses connaissances en microbiologie. Aussi est-ce dans un laboratoire de bactériologie qu'il avait terminé la guerre de

1914-1918 à l'Armée d'Orient à côté de notre collègue Etienne Burnet.

La paix revenue, la Faculté de Médecine de Montpellier et l'Institut Bouisson-Bertrand trouvèrent en Lisbonne un successeur tout désigné au Professeur Rodet qui abandonnait la chaire de Microbiologie et la direction de ce dernier établissement pour rentrer à Lyon.

C'est dans ces doubles fonctions que, jusqu'à sa mort, s'est déroulée la vie scientifique de notre collègue, à part une interruption d'une année pendant laquelle il était venu à l'Institut Pasteur diriger, après la disparition de Delezenne, le service de son ancien Maître, mais, ce service n'ayant pas été maintenu, il avait été heureux de retourner dans son pays natal pour lequel il avait un très profond attachement, et d'y reprendre les fonctions dans lesquelles il s'était acquis l'estime et la reconnaissance du corps médical et de la population. Il s'est en effet attaché à les faire bénéficier des diverses méthodes de vaccinations nouvelles et a lui-même réussi à mettre au point, avec ses collaborateurs P. Monnier, G. Roman et G. Renoux, un procédé d'immunisation contre la fièvre ondulante dans le centre de recherches qui a été créé à Montpellier pour l'étude de cette maladie et dont la direction lui avait été confiée.

Avec l'aide d'Aublant, Taylor, Dubois, Lafenêtre, Devèze et Balme, il a étudié le problème de la fièvre ondulante sous tous ses aspects : distribution géographique, épidémiologie, vaccinothérapie et chimiothérapie, et il a fait des recherches sur le pouvoir lysogène des cultures pures de *B. coli* et sur le suc pancréatique qui ont contribué avec ses travaux sur la fièvre ondulante à établir son renom scientifique et à le faire entrer récemment à l'Académie de Médecine comme membre correspondant national.

S'inspirant de ce qui a été réalisé pour la physiologie, il a eu le premier l'idée de créer une Association internationale de Microbiologistes de langue française qui a été fondée en 1937 grâce aux efforts conjugués du Professeur Jules Bordet, de la Direction de l'Institut Pasteur et de nos collègues Lépine et Prévot. Notre Société, qui est une émanation de cette Association, adresse un hommage ému et reconnaissant à la mémoire de notre collègue prématurément disparu et s'associe à la douleur de son fils, M. Maurice Lisbonne.

COMMUNICATIONS

MODIFICATION DE LA MÉTHODE DE TITRAGE RAPIDE DE LA PÉNICILLINE. BILAN D'ÉCARTS INDIVIDUELS

par A. R. PRÉVOT. M. PEYRÉ et M. DIGEON.

La méthode au vert-janus (1) a été employée au centre de titrage de la pénicilline de l'Institut Pasteur pendant cinq mois avec la souche « H A » de *Welchia perfringens* sans difficulté ni irrégularité.

(1) A.-R. PRÉVOT, ces *Annales*, 1946, 72, 471.

Après ce délai, brusquement sont apparues des irrégularités d'étalonnage, des incubations de plus en plus longues, des interprétations impossibles par suite de l'existence de tubes aberrants dans les séries.

En examinant la souche de titrage nous avons observé l'apparition d'une mutation se manifestant surtout par des colonies irrégulières en gélose profonde. Le repiquage des colonies irrégulières donne 50 p. 100 environ des deux formes ; le repiquage des colonies lenticulaires donne la même proportion des deux formes. C'est une mutation irréversible et nous n'avons pas pu retrouver la forme normale permettant les titrages rapides et réguliers. Nous avons tout d'abord cherché à remplacer cette souche par une autre souche de la même espèce. Mais les 49 souches de *perfringens* de notre collection n'ont pas présenté la sensibilité indispensable à un titrage précis : elles se sont étalonnées entre 4 et 20 unités Oxford alors que la souche H A était stable à 0,5 unités. Nous avons dû nous adresser à d'autres espèces. Parmi les nombreuses espèces essayées, nous en avons retenu deux : *Cl. septicum* s'étalonnant en général à 0,5 et *Cl. butyricum* en général à 0,4. Le premier ne permet qu'un titrage semi-rapide (cinq à six heures). Le deuxième au contraire permet un titrage presque aussi rapide qu'avec *W. perfringens* : deux à trois heures.

Nous avons cherché à déterminer l'ordre de grandeur des écarts individuels par la méthode au vert-janus ainsi modifiée.

Deux opérateurs M. P. et M. D., complètement isolés, opérant dans deux pièces différentes, avec du matériel différent ont effectué en double 56 titrages répartis en 14 séries comprenant chacune deux opérations : étalonnage de la souche contre une solution de pénicilline de titre connu ; titrage de 1 à 5 échantillons de solutions de pénicilline de titre inconnu (urine, filtrat de *Penicillium notatum*, jus de récupération concentré). Nous donnons ici à titre d'exemple le protocole du titrage n° XII.

Protocole du titrage n° XII.

Souche *Cl. butyricum*.

Étalonnage : M. D. : 0,5 U ; M. P. : 0,5 ; écart : 0.

NUMÉRO DES SOLUTIONS à titrer :	DOSE inhibitrice en centimètre cube	TITRES en Unités Oxford par centimètre cube	TITRE MOYEN	ÉCARTS	ERREUR RELATIVE p. 100
A. P. 6 1/1.000	M. D. . . . 0,6 M. P. . . . 0,5	833 1.000	916,5	83,5	9,1
P. 6 1/10.000	M. D. . . . 0,3 M. P. . . . 0,4	16.660 12.500	14.580	2.080	14,9
A. P. 20 1/1.000	M. D. . . . 0,2 M. P. . . . 0,2	2.500 2.500	2.500	0	0
P. 20 1/10.000	M. D. . . . 0,2 M. P. . . . 0,2	25.000 25.000	25.000	0	0
E. a. 21 1/100	M. D. . . . 0,1 M. P. . . . 0,1	500 500	500	0	0

Les résultats des 14 séries de titrage sont résumés dans le tableau ci-dessous.

NUMÉRO de la série	ÉCARTS P. 100 dans l'étalonnage de la souche	ÉCARTS P. 100 DANS LE TITRAGE des solutions inconnues				
		1	2	3	4	5
I	0	0	20	0		
II	0	0	4,7	10,6	0	
III	7,6	8,6	16			
IV	14,2	3,2				
V	14,2	14,2	5			
VI	0	11,1				
VII	0	0				
VIII	15,6	27,3				
IX	0	7,6	0			
X	20	20	20	20	27,1	
XI	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1
XII	0	9,1	14,9	0	0	0
XIII	0	0	14,2	0	0	0
XIV	7,6	7,6	12,4	7,6	18,6	7,6

On voit par là que les deux opérateurs ont trouvé les mêmes résultats dans 21 cas et des résultats différents dans 35 cas. Les erreurs relatives de chaque titrage vont de 3,2 à 27,3.

Fréquence des erreurs relatives.

VALEUR de l'écart	0	3,2	4,7	5	7,6	8,6	9,1	10,6	11,1	12,4	14,2	14,9	15,6	18,6	20	27,3
Fréquence de l'écart.	21	1	1	1	6	1	1	1	7	1	4	1	2	1	4	3

Les erreurs les plus fréquentes ont été :

6 fois	7,6 p. 100
7 fois	11,1 p. 100
4 fois	14,2 p. 100
4 fois	20 p. 100

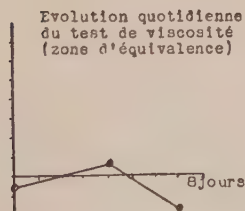
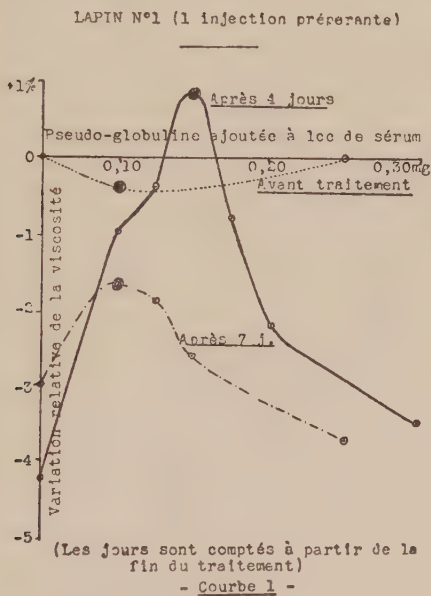
La moyenne arithmétique des erreurs relatives a été de 8,5 p. 100. Elle est donc de l'ordre des erreurs rencontrées habituellement dans les titrages biologiques. Elle semble moins élevée que dans la méthode d'Oxford, ce qui tient, à notre avis, à trois causes : remplacement de l'ensemencement par gouttes (méthode d'Oxford) par 0,1 cm³ mesuré à la pipette de précision ; emploi de cultures homogénéisées par brassage et, enfin, lecture facilitée par la décoloration de l'indicateur.

(Institut Pasteur. Centre de recherches sur la pénicilline.)

RENSEIGNEMENTS FOURNIS PAR LES TECHNIQUES DE FLOCCULATION ET DE VISCOSITÉ SUR LA FORMATION DES ANTICORPS

par J. LOISELEUR, J. J. PÉREZ et M^{lle} C. SERGENT.

Nous avons cherché à suivre les étapes successives de la formation des anticorps en employant simultanément les techniques de flocculation et de viscosité (1).

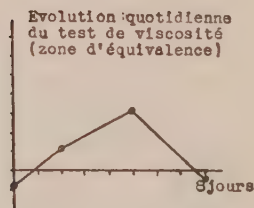
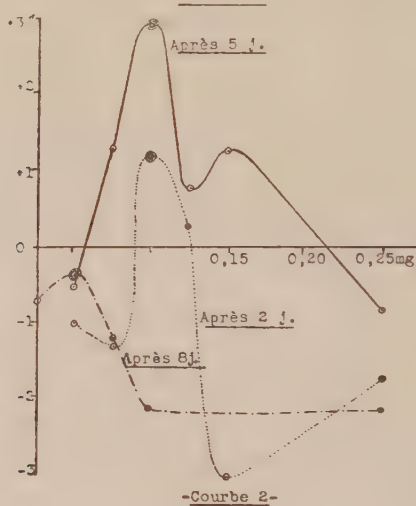


(1) La technique a été exposée par l'un de nous, C. R. Acad. Sci., 1946, 222, 159.

4 lapins (de 2 à 3 kg.) sont préparés par un nombre variable d'injections intraveineuses de pseudo-globuline de cheval (concentration de la solution = 6,69 g. p. 1.000). Le tableau reproduit la cadence des injections :

	LAPIN I	LAPIN II	LAPIN III	LAPIN IV
Premier jour	2 cm ³	0,5 cm ³	0,5 cm ³	0,5 cm ³
Quatrième jour . . .		1	0,5	0,5
Sixième jour		2	1	0,5
Huitième jour			1	1
Onzième jour			2	1
Treizième jour			2	2
Quinzième jour . . .				2

LAPIN N° II (3 injections préparantes)



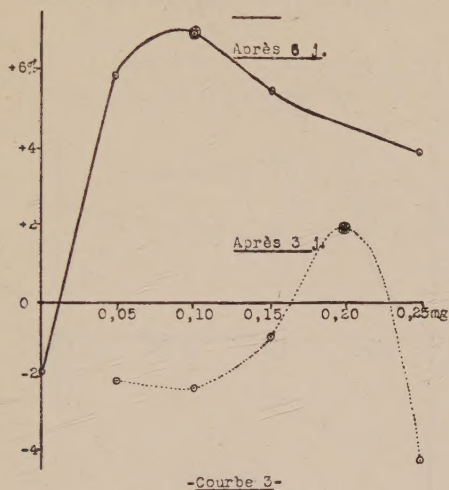
A différents intervalles à partir de la dernière injection, on prélève du sang pour faire sur le sérum les épreuves de floculation et de viscosité.

Le pouvoir floculant n'est apparu que dans le sérum du lapin IV, celui qui a subi la préparation la plus longue, le sixième jour après la

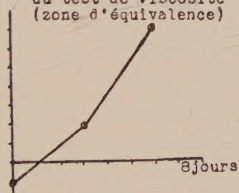
dernière injection. C'est la seule indication fournie par la méthode de floculation.

Au contraire la méthode de viscosité permet de suivre, d'une façon continue, l'élaboration des anticorps. Pour que l'expérience fût complète, il aurait fallu pratiquer l'épreuve de viscosité pendant chacun des huit jours consécutifs à la fin du traitement ; par suite de l'impossibilité de pratiquer tous les jours à un lapin un prélèvement de 25 cm³

LAPIN N° III (6 injections préparantes)



Evolution quotidienne du test de viscosité (zone d'équivalence)



de sang, il a fallu limiter à deux ou trois le nombre de ces épreuves de viscosité.

L'ensemble des résultats est représenté par les courbes 1, 2, 3 et 4 :

La courbe 1 montre que l'épreuve de viscosité, négative avant le traitement, devient très légèrement positive quatre jours après l'injection préparante unique, témoignant, dès ce moment, de l'apparition d'une adaptation spécifique du sérum à la pseudo-globuline. Après trois jours, la réaction est redevenue négative. Cette évolution des propriétés du sérum apparaît, d'une façon plus satisfaisante, en portant en abscisse le nombre de jours et en ordonnée la hauteur du test de viscosité : c'est ce qui figure sur la petite courbe annexée à la courbe 1.

Pour le lapin préparé avec 3 injections (courbe 2), on constate l'accroissement du phénomène. Pour alléger le dessin, on n'a pas figuré la courbe avant traitement. Dès le deuxième jour après la dernière injection, la réaction de viscosité est positive. Elle atteint son maximum le cinquième jour et redevient négative le huitième jour.

Enfin pour un nombre plus élevé des injections préparantes (6 et 7 injections), les phénomènes prennent une ampleur plus considé-

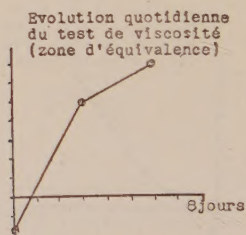
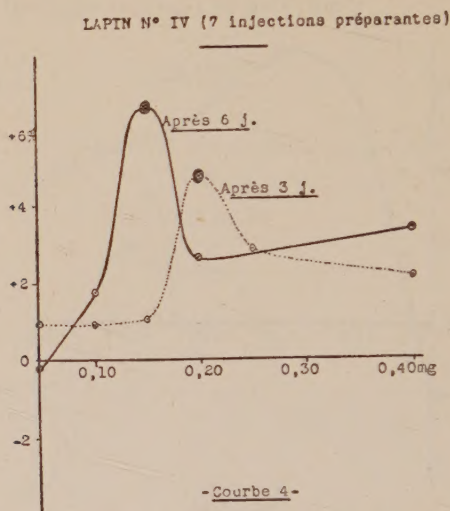


table (courbes 3 et 4). On doit noter d'autre part la persistance accrue de la réaction.

L'ensemble de ces expériences peut être résumé en superposant chacune des courbes d'évolution quotidienne 1, 2, 3 et 4. La courbe 5 ainsi obtenue démontre la *continuité* des phénomènes. On constate, sous l'influence d'un nombre croissant d'injections préparantes, l'élévation d'abord rapide du maximum de viscosité qui reste stationnaire après 6 ou 7 de ces injections.

On note encore un déplacement chronologique dans l'ordre d'apparition du maximum de viscosité :

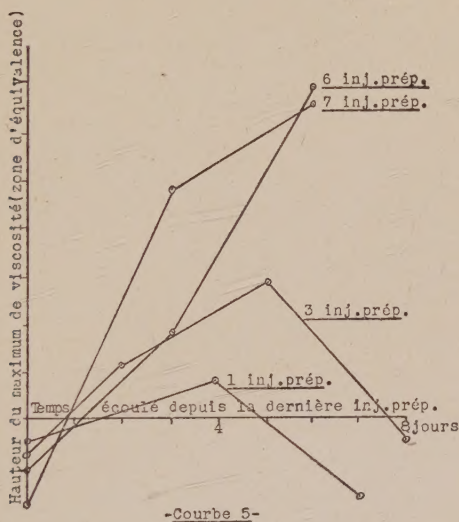
Ce maximum est atteint le quatrième jour après 1 injection prépa-

rante le cinquième jour après 3 injections préparantes ; le sixième jour après 6-7 injections préparantes.

En résumé une modification sérique apparaît dès la première injection préparante et cette modification augmente avec l'intensité de la préparation, pour se superposer finalement avec l'apparition du pouvoir floculant. On peut se demander si c'est la qualité de l'anticorps qui évolue au cours de la préparation. Autrement dit, l'anticorps décelé par l'épreuve de viscosité est-il le même que celui qui provoque

LAPINS PRÉPARÉS À LA PS-GLOBULINE

ÉVOLUTION QUOTIDIENNE DU TEST DE VISCOSITÉ
(Zone d'équivalence) CONSÉCUTIVEMENT À UN
NOMBRE VARIABLE D'INJECTIONS PRÉPARANTES.



la floculation ? On ne voit pas la raison qui s'opposerait à les identifier, la même « fonction anticorps » pouvant, selon la perfection de son élaboration, permettre l'accolement spécifique des molécules d'antigène et d'anticorps ou entraîner leur floculation. Ces expériences permettent ainsi d'assister à la transition entre l'anticorps définitif et une sorte de pré-anticorps dont la molécule semble se parfaire au cours de la période de préparation de l'animal. Pour le moment (2), l'interprétation la plus simple de ces expériences est d'imaginer qu'au contact de l'antigène le « motif spécifique » se dessine de plus en plus complètement sur la molécule sérique, sans discontinuité brusque.

(Institut Pasteur, Service de Chimie-Physique.)

(2) L'analyse de ces sérums par électrophorèse permettra de juger la valeur de cette hypothèse.

Le Gérant : G. MASSON.

